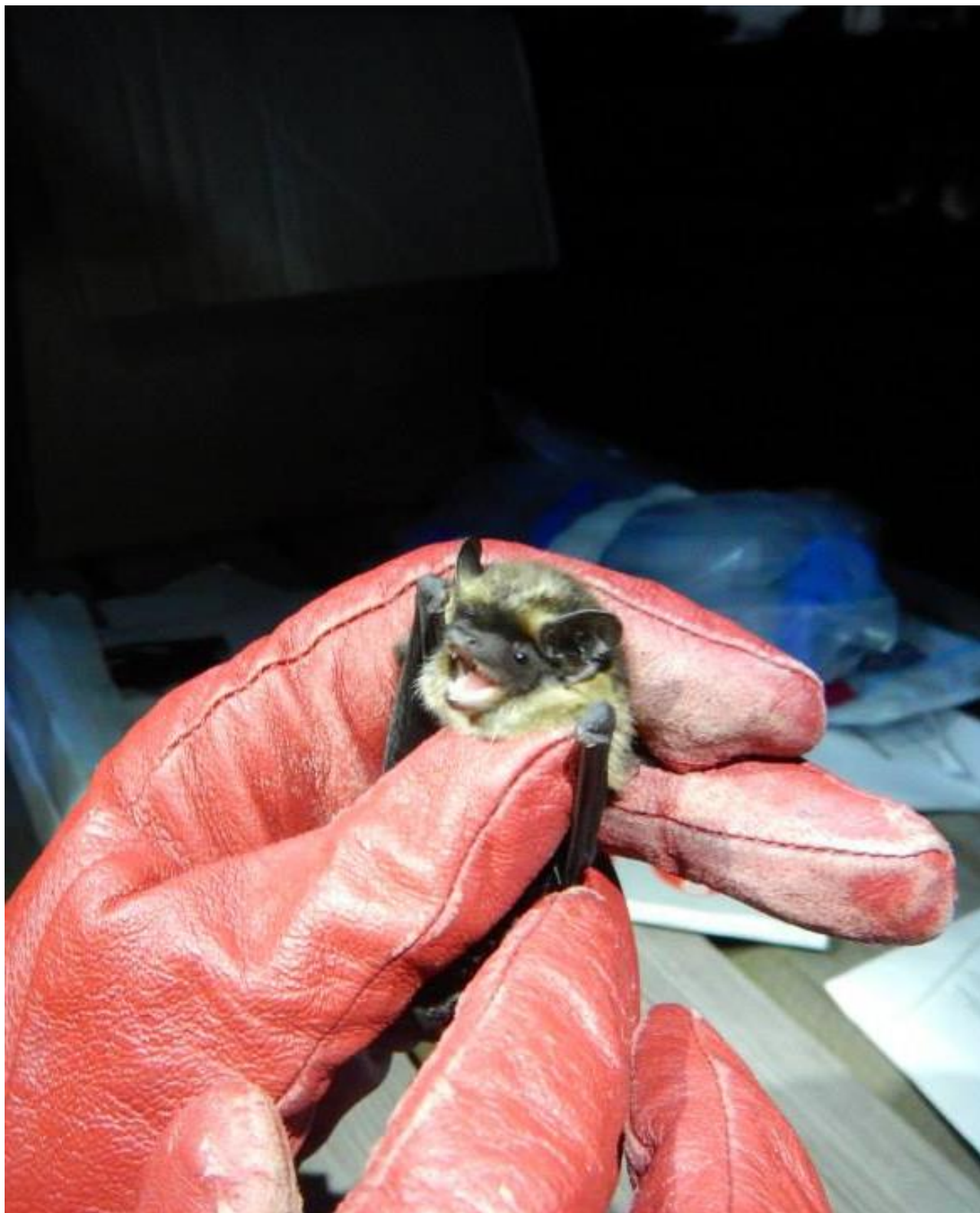


Suomen lepakoiden kantamat korona- ja paramyxovirukset

ILKKA KIVISTÖ

BIO- JA YMPÄRISTÖTIETEELLINEN TIEDEKUNTA

LOKAKUU 2018





Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Ekologian ja evoluutiobiologian maisteriohjelma	
Tekijä – Författare – Author Ilkka Kivistö			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Suomen lepakoiden kantamat korona- ja paramyxovirukset			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Ekologia ja evoluutiobiologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma		Aika – Datum – Month and year Lokakuu 2018	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 46
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Lepakot ovat suuri, monimuotoinen ja ekologisesti merkittävä nisäkäslahko. Viime vuosikymmenien aikana ne ovat paljastuneet myös merkittävien zoonottisten taudinaiheuttajien kantajiksi. Suomessa esiintyy kolmetoista lepakkolajia, joista suurin osa esiintyy täällä levinneisyysalueensa pohjoislaidalla ja joiden kantamista taudinaiheuttajista on tehty vielä hyvin vähän tutkimuksia. Tutkielmassani selvitan korona- ja paramyxovirusten esiintymistä eteläisen Suomen lepakoilla vuosina 2013-2016. Lisäksi pyrin kerätyn aineiston perusteella selvittämään, onko näytteitä luovuttaneiden lepakoiden iällä, näytteiden keruukuukaudella tai näytteiden keruualueella vaikutusta löydettyjen virusten esiintyvyyteen. Aineistona käytettiin muiden tutkimusprojektien yhteydessä lepakoilta kerättyjä uloste- ja anaalipyhköisnäytteitä sekä lepakoiden päivehtimispaikoilta kerättyjä ulostenäytteitä. Näytteistä eristettiin RNA ja ne seulottiin koronaviruksia ja paramyxoviruksia tunnistavilla ja optimoiduilla kvantitatiivisilla käänteistranskriptio-PCR-menetelmillä (RT-qPCR) ja löydökset varmistettiin tavallisilla käänteistranskriptio-PCR-menetelmillä (RT-PCR).</p> <p>Jälkimmäisistä reaktioista saadut tuotteet myös sekvensoitiin. Ulostenäytteiden seulonnan tuloksista kertyneestä aineistosta tehtiin tilastolliset analyysit yleistetyillä lineaarisilla sekamalleilla, joissa vastemuuttujana käytettiin viruksen esiintymistä ja mallin muuttujina näytteen luovuttaneen lepakon ikäryhmää ja lajia, näytteen keräyskuukautta ja eliömaakuntaa, josta näyte oli kerätty. Mallien satunnaistekijöinä käytettiin näytteiden keräyskuntaa tai näytteiden keräysvuotta. Sekvenssiaineistosta tehtiin fylogeneettiset analyysit käyttäen suurimman todennäköisyyden (Maximum Likelihood) menetelmää ja Bayesilaista menetelmää, joiden tuloksina saatiin kaksi fylogeneettista puuta. Neljän vuoden aineistosta todettiin yhteensä 18 lepakkoyksilöä, jotka kantoivat koronaviruksia, mutta paramyxoviruksia ei aineistosta löydetty. Tilastolliseen tarkasteluun hyväksyttiin 77 ulostenäytettä, joista 13 oli positiivisia koronaviruksille. Anaalipyhköisnäytteistä kerättiin 38 kappaletta ja näistä 5 oli positiivisia koronaviruksille. Päivehtimispaikoilta kerättyjä ulostenäytteitä tutkittiin 28 kappaleita ja näistä 4 oli koronaviruksen positiivisia. Koronaviruksia löydettiin Varsinais-Suomen, Uudenmaan, Etelä-Pohjanmaan ja Pohjois-Savon eliömaantieteellisiltä alueilta. Uloste- ja anaalipyhköisnäytteiden perusteella koronaviruksia esiintyy Suomessa pohjanlepakoilla, isoviiksisiipoilla, vesisiipoilla ja viiksisiipoilla. Tutkielmassa esitellään ensimmäinen pohjanlepakon beetakoronaviruslöytö. Tämä virus ryhmittyy fylogeneettisissa puissa samaan haaraan muiden saman lepakkosuvun kantamien beetakoronavirusten kanssa ja on samalla melko läheistä sukua MERS-koronavirukselle. Tutkielmassa esitellään myös ensimmäinen isoviiksisiipan koronaviruksen löytö, joka fylogeneettisten analyysien perusteella ryhmittyy samaan fylogeneettisen puun haaraan luxemburgilaisen ruskosiipan alfakoronaviruksen kanssa. Eniten koronaviruksia löydettiin vesisiipoilta, jotka suurimmalta osin ryhmittyivät samaan fylogeneettisen puun haaraan. Merenkurkussa sijaitsevasta Mustasaaren kunnasta kerätystä vesisiipan ulostenäytteestä löydetty sekvenssi kuitenkin sijoittui erilleen muista suomalaisista sekvensseistä ja eteläisestä Euroopasta todettujen sekvenssien joukkoon, mikä voi viitata tämän alueen lepakkopopulaation ja sen kantamien virusten levinneen Suomeen läntistä reittiä. Tutkielman tulokset luovat hyvän pohjan jatkotutkimuksille, joissa voidaan selvittää virusten tarkempaa esiintyvyyttä sekä niiden tarkempia ominaisuuksia.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Chiroptera, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Eptesicus nilssonii, Myotis brandtii, Myotis daubentonii			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Tarja Sironen			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Ekologian ja evoluutiobiologian osaston käsikirjasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo

1	Johdanto	1
1.1	Lepakot, monimuotoinen ja ekologisesti merkittävä nisäkäslahko	1
1.2	Suomen lepakot	2
1.3	Lepakot taudinkantajina	3
1.4	Tutkielmassa käsiteltävät virukset	4
1.4.1	Koronavirukset	5
1.4.2	Paramyksovirukset.....	6
1.5	Tutkimuskysymykset	7
2	Aineisto ja menetelmät	8
2.1	Näytteiden keruu ja RNA:n eristys	8
2.2	RT-qPCR ja RT-PCR –menetelmät sekä sekvensointi	11
2.2.1	RT-qPCR-seulontamenetelmien alukkeet	11
2.2.2	RT-qPCR-seulontamenetelmien optimointi	12
2.2.3	Seulonassa positiivisiksi todettujen näytteiden varmentaminen.....	13
2.3	Tilastolliset menetelmät	14
2.4	Fylogeneettiset menetelmät koronavirussekvensseille	15
2.5	Kartat	17
3	Tulokset	18
3.1	Positiiviset löydökset	18
3.2	Tilastolliset analyysit.....	23
3.3	Fylogeneettiset analyysit	26
4	Tulosten tarkastelu	29
4.1	Koronavirukset suomalaisissa lepakkolajeissa	29
4.2	Ei paramyksovirusia suomalaisissa lepakoissa	32
4.3	Virhelähteet	32
4.4	Tulevat tutkimukset.....	33
4.5	Yhteenveto.....	35
5	Kiitokset.....	35
6	Lähdeluettelo.....	36
7	Liitteet	42
7.1	PCR-reaktiot ja ohjelmat.....	42
7.2	GenBankista noudetut sekvenssit	44

Kannen kuva: Pohjanlepakko (*Eptesicus nilssonii*). Kuva on tutkielman kirjoittajan ottama.

1 JOHDANTO

Tutkin eteläisen Suomen lepakoita korona- ja paramyksen virusten kantajina. Näitä viruksia on löydetty lepakoilta muualta Euroopasta ja näihin ryhmiin kuuluvien virusten on todettu siirtyneen eläimistä ihmisiin. Tutkimuksen ensisijaisena tavoitteena on löytää kyseisiä viruksia suomalaisista lepakoista.

1.1 LEPAKOT, MONIMUOTOINEN JA EKOLOGISESTI MERKITTÄVÄ NISÄKÄSLAHKO

Lepakot (Chiroptera) ovat lentämiseen ja kaikuluotaukseen kykeneviä nisäkkäitä, jotka muodostavat toiseksi suurimman nisäkäslahkon heti jyrsijöiden (Rodentia) jälkeen. Noin 1100–1200 lepakkolajia jakaantuvat 19 heimoon, vaikkakin arvio lajimäärästä tarkentuu edelleen (Simmons 2005, Kunz ym. 2011, IUCN 2017). Vanhimmat kokonaiset lepakkofoossiilit ovat peräisin eoseenikaudelta ja ovat 52 miljoonaa vuotta vanhoja (Simmons ym. 2008). Suurin osa nykyisistä lepakkoheimoista oli kehittynyt eoseenikauden loppuun mennessä (Teeling ym. 2005). Lepakoita elää kaikilla mantereilla Etelämannerta lukuun ottamatta ja niistä on evoluution myötä kehittynyt monenlaisiin elinympäristöihin ja ravinnonlähteisiin erikoistuneita lajeja (Lappalainen 2003, IUCN 2017). Lepakoiden varhainen kehityshistoria on vielä epäselvä erityisesti kaikuluotauksen syntyvän osalta (Springer 2013). Molekyyli-systemaattisten menetelmien perusteella vaikuttaa siltä, että lepakot voidaan jakaa kahteen alalahkoon: Yinpterochiroptera, johon kuuluvat hedelmälepakot ja jotain pienlepakkoheimoja, ja Yangochiroptera, johon kuuluvat loput pienlepakot (Teeling ym. 2005, Lei ja Dong 2016). Tämä luokittelu poikkeaa aiemmasta luokittelusta, jossa lepakot jaettiin ravinnon ja elintapojen perusteella alalahkoihin Megachiroptera (hedelmälepakot) ja Microchiroptera (kaikuluotaavat lepakot) (Lappalainen 2003).

Suurin osa lepakoista (noin 70 %) on hyönteissyöjiä, minkä lisäksi reilu neljäsosa käyttää ravinnokseen hedelmiä, siitepölyä ja/tai mettä. Pieni osa lajeista syö kalaa, sammakoita, pieniä nisäkkäitä ja lintuja, minkä lisäksi kolme Etelä-Amerikkalaista lajia saa ravintonsa selkärankaisten verestä (Lappalainen 2003). Lepakot tuottavat monia hyödyllisiä ekosysteemipalveluita, kuten viljelykasvien tuhohyönteisten torjuntaa, kasvien pölytystä ja niiden siementen levitystä. Tämän lisäksi lepakoiden typpirikasta ulostetta käytetään lannoitteena viljelyksillä (Kunz ym. 2011). Hyönteisiä syövät lepakot voivat pohjoisamerikkalaisen tutkimuksen mukaan tuottaa keskimäärin 74 dollarin säästöt jokaista viljeltyä eekkeriä kohti, mikä tarkoittaa noin 167 euron säästöä jokaista viljeltyä hehtaaria kohti, eli ne tarjoavat maanviljelyn kannalta merkittävää ekosysteemipalvelua rajoittamalla tuholaishyönteisten määrää (Boyles ym. 2011). Espanjassa tehdyssä tutkimuksessa lepakoiden arvioitiin tuottavan vähintään 21 euroa säästöä hehtaaria kohti pelkästään torjunta-aineiden vähemmän käyttötarpeen seurauksena (Puig-Montserrat ym. 2015).

Suuresta lajimäärästä huolimatta lepakot ovat melko vähän tutkittu ryhmä. Lepakot lentävät pimeällä ja niiden kaikuluotausäänet eivät ole kuultavissa paljaalla korvalla. Niiden ekologiaa on päästy kunnolla tutkimaan vasta tekniikan kehityttyä tasolle, jolla ultraäänien havainnointi on tullut mahdolliseksi. Ensimmäinen lepakoiden aisteja käsittelevä tutkimus esiteltiin vuonna 1794, mutta lepakoiden kaikuluotauksen perustuminen ultraääniin keksittiin vasta vuonna 1920 ja näiden ultraäänten ensimmäiset mittaukset ja visualisoinnit ovat vuodelta 1938 (Tupinier 2015). Ensimmäisissä lepakoiden rengastuksissa käytettiin linnuille ja kaloille suunniteltuja merkkejä ja lepakoiden rengastukset tätä nimenomaista tarkoitusta varten kehitetyillä renkailla alkoivat Yhdysvalloissa vuonna 1932 ja itsenäisesti Euroopassa 1930-luvun alkupuolella (Kunz ja Weise 2009). Lepakoiden rengastusmäärät kasvoivat näillä alueilla 1960-luvulla, minkä lisäksi rengastuksia alettiin tehdä myös muualla maailmassa (Kunz ja Weise 2009). Lepakotutkimusta on siis tehty maailmanlaajuisesti suhteellisen lyhyen aikaa muihin helpommin tutkittaviin nisäkkäisiin verrattuna. Kun otetaan huomioon myös merkittävät harppaukset molekyylibiologisten menetelmien kehityksessä, voidaan todeta, että lajiryhmässä riittää vielä paljon tutkittavaa.

1.2 SUOMEN LEPAKOT

Suomessa tavattavat lepakot ovat Yangochiroptera-alalahkoon ja aitolepakkojen (Vespertilionidae) heimoon kuuluvia hyönteissyöjiä. Maassamme on tavattu yhteensä kolmetoista eri lepakkolajia, joista viisi on yleisiä (Kyheröinen ym. 2014). Loput kahdeksan lajia ovat harvalukuisempia tai satunnaisia vierailijoita (Taulukko 1). Suomi on näiden kaikkien lajien levinneisyysalueen pohjoislaidalla ja erityisesti kylmät talvet rajoittavat eteläisempien lajien leviämistä maahamme (Lappalainen 2003).

Taulukko 1 Suomessa tavattavat lepakkolajit ja niiden yleisyydet yleisimmästä harvalukuisimpaan (Kyheröinen ym. 2014, Suomen lepakkotieteellinen yhdistys ry 2017).

Laji	Levinneisyys
Pohjanlepakko (<i>Eptesicus nilssonii</i>)	Yleinen, esiintyy koko maassa
Vesisiippa (<i>Myotis daubentonii</i>)	Yleinen Etelä- ja Keski-Suomessa
Isoviiksihiippa (<i>Myotis brandtii</i>)	Yleinen Etelä- ja Keski-Suomessa
Viiksihiippa (<i>Myotis mystacinus</i>)	Yleinen Etelä- ja Keski-Suomessa
Korvayökkö (<i>Plecotus auritus</i>)	Yleinen Etelä- ja Keski-Suomessa
Pikkulepakko (<i>Pipistrellus nathusii</i>)	Harvalukuinen ja muuttava laji maan etelä- ja lounaisosissa, joitain havaintoja lisääntymisyhdyskunnista
Ripsihiippa (<i>Myotis nattereri</i>)	Harvalukuinen eteläisessä suomessa, talvehtimishavaintoja maan kaakkois- ja lounaisosissa
Kimolepakko (<i>Vespertilio murinus</i>)	Muuttava laji, tavattu harvinaisena Etelä-Suomessa
Isolepakko (<i>Nyctalus noctula</i>)	Muuttava laji, tavattu harvinaisena Etelä-Suomessa
Vaivaislepakko (<i>Pipistrellus pipistrellus</i>)	Muuttava laji, harvalukuinen vierailija maan eteläosissa
Kääpiölepakko (<i>Pipistrellus pygmaeus</i>)	Muuttava laji, harvalukuinen vierailija maan etelä- ja lounaisosissa
Lampisiippa (<i>Myotis dasycneme</i>)	Kaksi havaintoa Kaakkois-Suomesta
Etelänlepakko (<i>Eptesicus serotinus</i>)	Kaksi havaintoa

Suomalaisia lepakoita on rengastettu nykyisillä menetelmillä vuodesta 2004 asti, minkä lisäksi maamme lepakoista on tähän mennessä tutkittu muun muassa metsissä elävien lepakoiden ekologiaa ja suojelua sekä lepakoiden muuttoa. Parhaillaan Suomessa tutkitaan muun muassa lepakoiden talvehtimista. Lisäksi kaavoitusprojektien ja ympäristölupahakemusten yhteydessä toteutettavissa ympäristöselvityksissä tehdään usein lepakkokartoituksia, mutta näistä saadut tulokset ovat hajallaan. Kaikki Suomen lepakot ovat olleet suojeltuja vuodesta 1923 asti, mutta nykyään niitä uhkaavat muun muassa metsätalouden muutokset sekä päivehtimis-, lisääntymis- ja talvehtimispaikkojen tuhoutuminen ja niissä lisääntyneet häiriötekijät. Lisäksi rakennettujen alueiden laajeneminen ja huonosti suunniteltu tuulivoimaloiden sijoittelu aiheuttaa haittaa lepakoiden saalistusalueilla ja muuttoreiteillä (Kyheröinen ym. 2014).

1.3 LEPAKOT TAUDINKANTAJINA

Tauteja, jotka pystyvät siirtymään eläimistä ihmisiin, kutsutaan zoonooseiksi ja monet ihmisissä kiertävistä taudeista ovat alun perin lähtöisin eläimistä (Kareish ym. 2012). Monet maailmanlaajuisesti leviävistä epidemioista eli pandemioista ovat zoonoottisten virusten aiheuttamia (Morse ym. 2012). Jyrsijät ovat erityisen merkittävä zoonoottisten virusten lähde, mutta lepakot kantavat lajimäärään nähden erityisen laajaa kirjoa erilaisia viruksia (Calisher ym. 2006, Luis ym. 2013, Kreuder Johnson ym. 2015). Lepakoista on löydetty jo ainakin 86 eri viruslajia, joista 33 lajia on zoonoottisia (Brierley ym. 2016, Olival ym. 2017). Lepakoiden fysiologiassa ja elintavoissa on monia sellaisia piirteitä, joiden epäillään lisäävän niiden merkitystä monenlaisten virusten isäntäeläiminä. Ne ovat pitkäikäisiä, ne muodostavat suuria ja tiiviitä yhdyskuntia ja ne pystyvät liikkumaan pitkiä matkoja (Calisher ym. 2006). Niillä on muista nisäkkäistä jonkin verran poikkeava immuunijärjestelmä, minkä lisäksi ne ovat sopeutuneet lentämisen aiheuttamaan korkeaan oksidatiiviseen stressiin tavoilla, jotka osaltaan auttavat niitä säätelemään solunsisäisten loisten, kuten virusten, lisääntymistä soluissa (Brook ja Dobson 2015).

Näistä ominaisuuksista huolimatta lepakoiden merkitys zoonoottisten taudinaiheuttajien kantajina on varsin uutta tietoa. Ensimmäinen lepakoilta löydetty zoonoosi on vuonna 1911 todettu raivotauti (rabies virus, *Lyssavirus*) ja tämän löydön jälkeen kului yli 80 vuotta, ennen kuin lepakoilta todettiin seuraava zoonoottinen virus (Brook ja Dobson 2015). Tämä tapahtui vuonna 1994, kun australialaisilla hevosilla ja niiden kanssa työskennelleillä ihmisillä alkoi esiintyä tappavaa tautia, jonka aiheuttajan todettiin kuuluvan paramyksamyksiin (Murray ym. 1995). Virus nimettiin Hendra-virukseksi ja sen luonnollisiksi kantajiksi paljastuivat paikalliset hedelmälepakkolajit (Halpin ym. 2000, Clayton ym. 2013). Muutamaa vuotta myöhemmin Malesiassa, Bangladeshissa ja Intiassa levinneen Hendra-virukselle hyvin läheistä sukua olevan Nipah-paramyksamyksen todettiin olevan myös lähtöisin hedelmälepakoista (CDC 1999, Clayton ym. 2013). Vuonna 2002 lepakoista lähtöisin oleva SARS-koronavirus (Severe Acute Respiratory Syndrome)

siirtyi ihmisiin Kiinassa Guangdongin ja Hong Kongin alueella, mistä se levisi pandemiaksi (Drosten ym. 2003, Hilgenfeld ja Peiris 2013, Drexler ym. 2014). Näiden ihmishenkiä vaatineiden ja merkittäviä taloudellisia vahinkoja aiheuttaneiden virusten löytymisen seurauksena lepakoiden viruksia alettiin kartoittaa hyvin aktiivisesti eri puolilla maailmaa ja tähän mennessä lepakoilta on löydetty lyssa-, paramykso- ja koronavirusten lisäksi runsaasti erilaisia viruksia, kuten hanta-, arena-, adeno-, astro-, influenssa-, alfa-, flavi-, bunya-, reo-, herpes-, picorna- ja papillomaviruksia (Calisher ym. 2006, Olival ym. 2017). Hedelmälepakot ovat varmistumassa myös filoviruksiin kuuluvien Marburg- ja Ebola-virusten luonnollisiksi kantajiksi (Han ym. 2016). Vuoden 2012 syyskuussa koronaviruksen nousivat taas pinnalle, kun MERS-koronavirus (Middle-East Respiratory Syndrome) todettiin Saudi-Arabiassa (Zaki ym. 2012). Tähän päivään mennessä se on levinnyt 27 maahan ja tartuttanut 2260 ihmistä, joista 803 on menehtynyt (WHO 2018).

Virusten osalta suomalaisista lepakoista on aiemmin raportoitu vain lyssaviruksiin kuuluvaa EBLV-2-virusta, jota on havaittu maassamme neljästi. Ensimmäinen tapaus on vuodelta 1985, jolloin lepakkotutkija kuoli tautiin (Jakava-Viljanen ym. 2010). Seuraava tapaus on vuodelta 2009, jolloin Turusta pyydystettiin tautia sairastanut vesisiippa ja tapauksen jälkeen suoritetuissa serologisissa seulonnoissa saman alueen vesisiipoista löydettiin myös vasta-aineita virukselle (Jakava-Viljanen ym. 2010, Nokireki ym. 2013). Kolmas tapaus on vuodelta 2016, kun Inkoosta löydettiin epäilyttävästi käyttäytynyt vesisiippa, joka myöhemmin kuoli tautiin, ja viimeisin on vuodelta 2018, jolloin Leppävirralta löydetyistä kuolleesta isoviiksisäipasta todettiin mahdollisesti uusi lyssavirustalaji, *Kotalahti bat lyssavirus* (Nokireki ym. 2017, Nokireki ym. 2018). Virusten lisäksi suomalaisilta lepakoilta on löydetty useita lajeja *Bartonella*-bakteereja (Veikkolainen ym. 2014, Lilley ym. 2015).

1.4 TUTKIELMASSA KÄSITELTÄVÄT VIRUKSET

Tutkielmassani käsittelen kahta RNA-virusten heimoa: koronaviruksia (heimo Coronaviridae) ja paramykosviruksia (heimo Paramyxoviridae). Näihin virusheimoihin kuuluvia viruksia on jo löydetty lepakoista muualta Euroopasta ja näihin heimoihin kuuluvien virusten on aiemmin todettu siirtyneen lepakoista ihmisiin (Gloza-Rausch ym. 2008, Drexler ym. 2012, Kurth ym. 2012). Jotkin eurooppalaisista aitolepakoista löydetyistä koronaviruksista ovat melko läheistä sukua MERS-koronavirukselle (Falcón ym. 2011, Lelli ym. 2013, De Benedictis ym. 2014), vaikkakin sen lähimmät sukulaiset on tähän mennessä löydetty Afrikasta (Ithete ym. 2013, Corman ym. 2014, Anthony ym. 2017). Molempien virusheimojen genomi koostuu yhdestä yksijuosteisesta RNA-molekyylistä, joka koronaviruksilla on positiivisäikeinen ja paramykosviruksilla negatiivisäikeinen (Takimoto ja Portner 2004, Fehr ja Perlman 2015). Yksijuosteinen RNA-genomi mahdollistaa näiden virusten todennäköisemmän siirtymän isäntälajista toiseen, sillä yksijuosteinen genomi on kaksijuosteista genomia alttiimpi mutaatioille (Woolhouse ym. 2005, Woo ym.

2009). Jokin näistä mutaatioista voi tapahtua esimerkiksi viruksen pintaproteiinia koodaavassa geenissä, jolloin viruspartikkeli voi käyttää uutta reseptoria isäntäsoluun tarttumiseen, tai RNA-polymeraasin kopiointitarkkuuteen vaikuttavassa geenissä, jolloin seuraavassa replikaatiosykliissä syntyy enemmän mutaatioita ja siten materiaalia luonnonvalinnalle (Woolhouse ym. 2005, Graham ja Baric 2010). Koinfektioiden, eli kun samaan isäntäsoluun tarttuu kaksi erillistä viruspartikkelia, yhteydessä tapahtuu myös rekombinaatiota varsinkin koronaviruksilla, mikä lisää näiden virusten muuntelukykä (Woo ym. 2009, Graham ja Baric 2010).

1.4.1 Koronavirukset

Koronavirusten genomi on yksi suurimmista mitä viruksista on löydetty, noin 30 000 nukleotidimäksen pituinen. Viruksen perimä toimii heti solun sisään päästyään lähetti-RNA:na, jonka koodaamana tuotetaan viruksen omaa RNA-polymeraasia, rakenneproteiineja ja replikaatiossa tarvittavia muita proteiineja. Viruksen RNA-polymeraasi tuottaa alkuperäisestä genomista negatiivisäikeisiä RNA-molekyyliä, jotka toimivat mallina viruksen genomien replikaatiossa. Viruksen genomi on viruspartikkelissa kiertänyt nukleoproteiinien ympärille nukleokapsidiksi. Viruspartikkeli on vaipallinen, eli viruspartikkelin ulkopinta muodostuu isäntäsolun solukalvosta kaapatusta lipidivaipasta. Vaippaan on uponneena viruksen omia pintaproteiineja, joista yksi on Spike-proteiini. Viruksen tunkeutuminen soluun perustuu Spike-proteiinin tarttumiseen isäntäsolun reseptoriin, minkä seurauksena viruspartikkeli siirtyy solun sisään endosytoosin avulla. Viruksen ympärillä oleva vaippa fuusioituu endosomin kalvoon, jolloin nukleokapsidi vapautuu solulimaan ja virus voi aloittaa lisääntymisensä solun sisällä. Virusten kokoaminen alkaa solulimakalvostossa, kun viruksen rakenneproteiineja ja uusia RNA-genomijuosteita on tuotettu riittävästi. Valmiit viruspartikkelit poistuvat solusta eksosytoosilla (Fehr ja Perlman 2015).

MolekyyliSYSTEMATIIKAN perusteella koronavirukset jaetaan nykyään alfa-, beeta-, gamma- ja deltakoronaviruksiin, jotka poikkeavat toisistaan muun muassa isäntäspesifisyyden suhteen. Lisäksi beetakoronavirukset jaetaan neljään eri kantaan (a, b, c ja d) (Woo ym. 2009). Koronavirukset löydettiin ensimmäisen kerran 1960-luvulla, jolloin niiden huomattiin olevan yksi kausiflunssan aiheuttajista ja niiden todettiin pystyvän aiheuttamaan myös keuhkokuumetta. Nykyään ihmisillä tiedetään kiertävän ainakin neljä tällaista koronaviruskantaa: alfakoronaviruksiin kuuluvat 229E ja NL63 ja beetakoronaviruksiin kuuluvat OC43 ja HKU1 (Jonsdottir ja Dijkman 2016). Lisäksi monilta koti- ja lemmikkieläimillä on omia koronaviruksia, kuten kanojen IBV (Infectious Bronchitis Virus), sikojen TGEV (Transmissible Gastroenteritis Coronavirus), kissojen FCoV (Feline Coronavirus) ja hiirten MHV (Murine Hepatitis Virus) (Woo ym. 2009). Koronavirukset leviävät pisaratartuntana sekä virtsan ja ulosteiden välityksellä ja ne infektoivat pääasiassa ylähengitysteiden ja ruuansulatuskanavan epiteelisoluja (Jonsdottir ja Dijkman 2016).

Beetakoronaviruksiin kuuluva SARS-koronavirus on aiempiin ihmisillä tavattuihin koronaviruksiin verrattuna poikkeuksellinen, sillä se tarttuu ihmisillä ylä- ja alahengitysteiden sekä ruuansulatuskanavan epiteeleissä esiintyvään ACE2-reseptoriin ja aiheuttaa näin vakavan alahengitystieinfektion (Kuhn ym. 2004). Myös viime vuosina aktiivisesti seurattu MERS-beetakoronavirus käyttää muista koronaviruksista poikkeavaa DPP4-reseptoria (Raj ym. 2013). Lepakoilla MERS-koronaviruksen käyttämää DPP4-reseptoria esiintyy laajalti ruuansulatuselimistössä, kun taas esimerkiksi ihmisellä sitä esiintyy vain syvällä hengityselimistössä (Widagdo ym. 2017).

SARS-pandemian jälkeen alkoi viruksen alkuperän selvittäminen. Aluksi virusta löydettiin villieläintoreilla myytävistä piennisäkkäistä, kuten naamaripalmunäädistä (*Paguma larvata*) ja supikoirista (*Nyctereutes procyonoides*), ja lopulta vuonna 2004 viruksen luonnolliseksi isäntälajiksi paljastuivat *Rhinolophus*-suvun herkkolepakot (Lau ym. 2005, Li ym. 2005, Hilgenfeld ja Peiris 2013). MERS-koronaviruksen alkuperää jäljitetään edelleen, mutta tällä hetkellä vaikuttaa siltä, että virus on siirtynyt väli-isäntinä toimiviin dromedaareihin *Neoromicia*-suvun siipoista (Ithete ym. 2013, Corman ym. 2014). Näiden virusten lisäksi lepakoilta on löydetty runsaasti muita beetakoronaviruksia ja alfakoronaviruksia kaikkialta maailmasta. Esimerkiksi ihmisen 229E-koronavirukselle läheistä sukua olevia viruksia on löydetty Ghanasta (Corman ym. 2015). Nykytietämys viittaa siis siihen, että lepakot ovat merkittäviä koronavirusten kantajia ja niistä on siirtynyt näitä viruksia muihin eläinlajeihin ja ihmisiin.

1.4.2 Paramykovirukset

Paramykovirusten perimä koostuu yhdestä negatiivisäikeisestä RNA-molekyylistä, eli isäntäsoluun päästyään viruksen perimästä käännetään positiivisäikeisiä lähetti-RNA-molekyyliä viruksen oman polymeraasin avulla ennen kuin viruksen omien proteiinien tuotanto voi alkaa. Myös paramykovirukset ovat vaipallisia viruksia, eli viruspartikkelin perusrakenne muistuttaa koronaviruspartikkelien rakennetta. Solun sisään päästäkseen viruspartikkeli tarttuu pintaproteiiniensa avulla isäntäsolun reseptoriin, jonka jälkeen viruksen vaippa fuusioituu solukalvoon ja viruspartikkelin sisällä oleva ribonukleokapsidi vapautuu solulimaan. Viruksen perimä käännetään positiivisäikeiseksi ja virusproteiinien tuotanto ja perimän replikoituminen alkaa solulimassa. Viruksen uudet ribonukleokapsidit siirtyvät muiden virusproteiinien kanssa solukalvolle, josta ne silmikoituvat solun ulkopuolelle uusiksi viruspartikkeleiksi (Takimoto ja Portner 2004). Eri paramykovirukset käyttävät erilaisia reseptoreita, kuten Ephrin-B2 ja SLAM/F1 -proteiineja tai siaalihappoja, mikä vaikuttaa niiden mahdollisuuksiin tarttua eri isäntälajeihin sekä viruksen hakeutumiseen eri kudoksiin ja sen aiheuttaman taudin oireisiin ja vakavuuteen (Thibault ym. 2017).

Paramykovirusten heimo on hyvin laaja ja siihen kuuluu useita ihmisten välillä tarttuvia virustauteja, kuten morbillivirusten suvun tuhkarokko ja rubulavirusten suvun sikotauti. Lisäksi koti- ja lemmikkieläimillä esiintyy paljon paramykoviruksia, kuten koirien penikkatautia ja lintujen Newcastleltautia. Ihmisen

toimesta sukupuuttoon hävitetyissä viruksissa isorokkoa seurannut karjaruttovirus (Rinderpest virus) kuului myös paramyksamoviruksiin (Pomeroy ym. 2008). Vuonna 1994 Brisbanessa, Australiassa, tuntematon tauti aiheutti paljon tuhoa hevostalleilla ja vaati myös ihmisuhreja (Murray ym. 1995). Tämä Hendra-virukseksi nimetty morbilliviruksille läheistä sukua oleva paramyksamovirus levisi ensin hevoslaitumien puissa päivehtineiden lepakoiden ulosteista tai muista eritteistä hevosiin ja niiden kautta ihmisiin (Clayton ym. 2013, Plowright ym. 2015). Myöhemmin malesialaisilla sikatiloilta alkoi levitä Nipah-virukseksi nimetty paramyksamovirus, joka myös vaati paljon kuolonuhreja (CDC 1999). Toista Nipah-viruskantaa on havaittu Intiassa ja Bangladeshissa, mutta näissä tapauksissa virus on todennäköisesti siirtynyt lepakoista ihmisiin alueella yleisesti juotavan taatelipalmun maitiaisnesteen välityksellä (Clayton ym. 2013). Nämä kaksi uutta virusta muodostavat oman henipavirusten suvun, jonka alkuperä on hedelmälepakoissa ja joiden siirtyminen ihmisiin vaikuttaisi olevan seurausta maankäytön ja villieläinten elinympäristön muutoksista (Clayton ym. 2013, Plowright ym. 2015).

Ensimmäiset lepakoiden paramyksamovirukset löydettiin jo 1970-luvulla, mutta niitä ei vielä silloin todettu zoonoottisiksi (Clayton ym. 2013). Henipavirusten ja hedelmälepakoiden välisten yhteyksien havaitsemista on seurannut suuri määrä tutkimuksia, joiden tulosten perusteella erilaisten paramyksamovirusten on todettu esiintyvän laajasti eri lepakkoheimoilla eri puolilla maapalloa, mukaan lukien siippojen heimolla Euroopassa (Drexler ym. 2012, Kurth ym. 2012, Pauly ym. 2017). Osa näistä paramyksamovirusta kantavista lajeista, kuten vesisiippa ja viikisiippa, esiintyy myös Suomessa (Drexler ym. 2012, Kurth ym. 2012). Tähän mennessä lepakosta löydetty paramyksamovirukset kuuluvat henipavirusten, morbillivirusten ja niiden lähisukuisten virusten, rubulavirusten ja pneumovirusten sukuihin. Lisäksi on huomattu, että jyrsijöiden, kuten metsämyyrien, uudet morbillivirukset ovat läheistä sukua lepakoiden vastaaville viruksille, joten virus on todennäköisesti jossain vaiheessa siirtynyt näiden lajien välillä suuntaan tai toiseen (Drexler ym. 2012).

1.5 TUTKIMUSKYSYMYKSET

Tarkastelen suomalaisten lepakoiden ja niiden elinympäristöjen vaikutuksia virusten esiintyvyyteen yleistettyjen lineaaristen sekamallien avulla ja löydettyjen virusten fylogeniaa bayesilaisilla ja suurimman todennäköisyyden (Maximum likelihood) -menetelmillä. Tutkimuksessa tarkastellaan seuraavia tutkimushypoteeseja:

1. Nuorilla lepakoilla esiintyy enemmän viruksia kuin vanhemmilla yksilöillä, sillä niille ei ole vielä ehtinyt syntyä vastustuskykyä viruksia vastaan ja niiden emoilta saadut vasta-aineet ovat alkaneet kadota verestä poikasten alkaessa saalistaa itsenäisesti. Nollahypoteesin mukaisessa tilanteessa virusta esiintyy yhtä paljon nuorissa ja vanhoissa yksilöissä.

2. Virukset esiintyvät lepakopopulaatioissa epidemioina, kun nuoria lepakoita, joilla ei ole vielä vastustuskykyä virusta vastaan, syntyy populaatioihin ja ne vieroittuvat emoistaan. Tällöin eri kuukausien välillä olisi havaittavissa eroja viruksen esiintyvyydessä. Nollahypoteesin mukaisessa tilanteessa kuukausien välillä ei ole eroa viruksen esiintyvyydessä.
3. Maantieteellisillä alueilla, eli tässä tutkimuksessa eliömaantieteellisillä alueilla, on eroa viruksen esiintyvyyden suhteen. Nollahypoteesin mukaisessa tilanteessa virusten esiintyvyydessä ei ole eroa alueiden välillä.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

Tutkielman menetelmät pohjautuivat aiempiin muualla julkaistuihin lepakoilla tehtyihin ja Suomessa muilla virusten isäntälajeilla tehtyihin tutkimuksiin. Menetelmiä on tarvittaessa muokattu ja optimoitu. Näytteinä käytettiin ensisijaisesti lepakoiden ulostetta, jota on suhteellisen helppo kerätä muun tutkimustoiminnan yhteydessä aiheuttamatta erityisiä ongelmia lepakoille. Lisäksi ulostenäytteet on todettu hyväksi virusten lähteeksi (Young ja Olival 2016). Aineistoa täydennettiin anaalipyyhkäisynäytteillä ja lepakoiden päivehtimispaikoista kerätyillä ulostenäytteillä.

Näytteet seulottiin kvantitatiivisilla käänteistranskriptio-PCR-menetelmillä (RT-qPCR), jotka hyvin optimoituina ovat herkkiä, tarkkoja ja nopeita suurten näytemäärien läpikäymisessä (Bustin ym. 2009). Seulonnassa positiiviseksi todetut näytteet varmistettiin käänteistranskriptio-PCR-menetelmillä (RT-PCR). Löydetyistä viruksista sekvensoitiin geenialueet, joita verrattiin muualta maailmasta löydettyjen virusten vastaaviin käyttäen fylogeneettisiä menetelmiä. Menetelmillä saatiin fylogeneettiset puut, joiden avulla voitiin tarkastella virusten isäntäspesifisyyttä ja lajien välisiä siirtymiä.

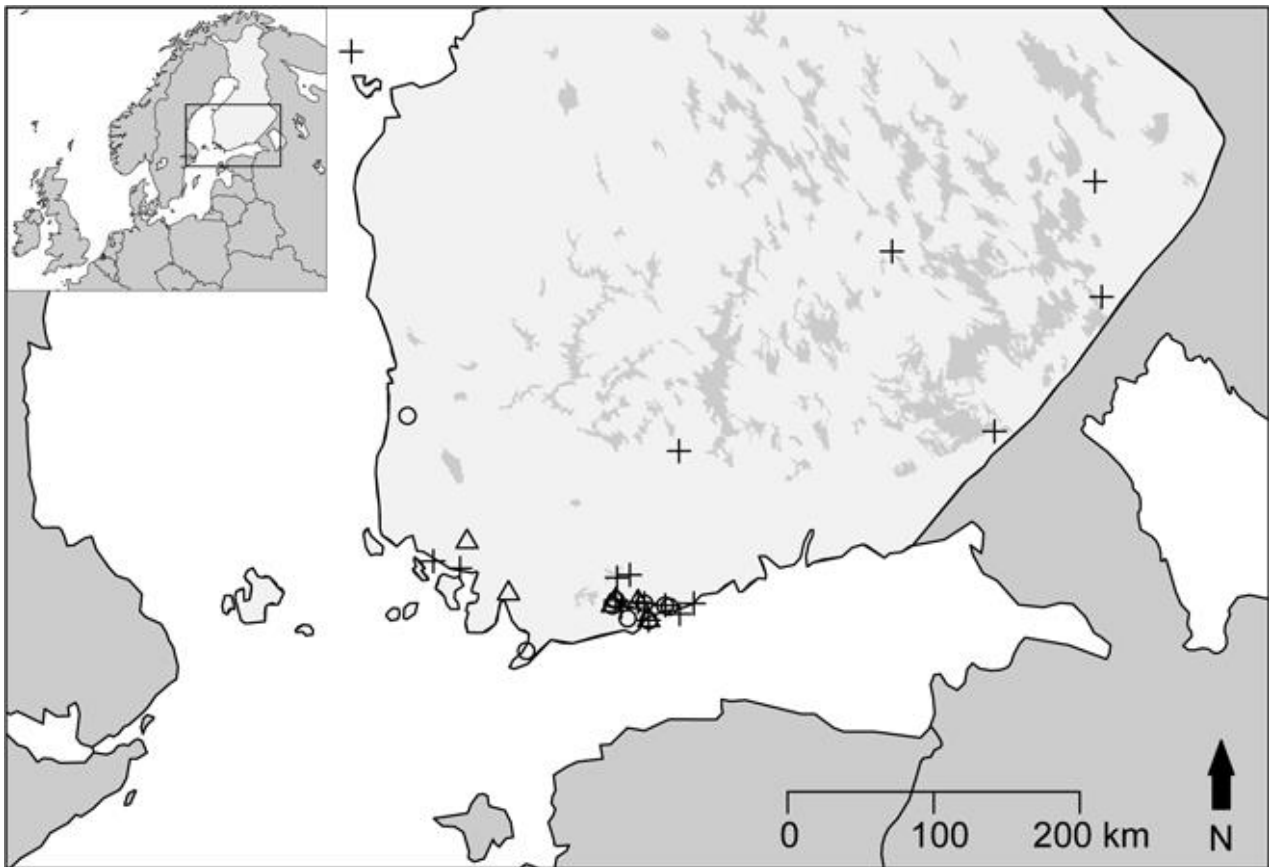
2.1 NÄYTTEIDEN KERUU JA RNA:N ERISTYS

Suomen lainsäädännön mukaan lepakot ovat rauhoitettuja (Luonnonsuojelulaki 1096/1996) ja niitä saa pyydystää vain elinkeino-, liikenne- ja ympäristökeskuksen (ELY-keskuksen) erityisluvalla, jonka Luonnontieteellinen keskusmuseo anoo kootusti. Rengastajan tulee toimittaa Luonnontieteellisen keskusmuseon rengastustoimistoon rengastuslupahakemuksen lisäksi tutkimus- ja rengastus/merkintäsuunnitelma ja rabies-rokotustodistus, minkä lisäksi rengastajan tulee olla suorittanut Luonnontieteellisen keskusmuseon järjestämä tentti, jossa mitataan lepakoiden koskevan lainsäädännön ja pyydystysmenetelmien tuntemusta sekä lajintuntemusta. Rengastajan tulee olla harjoitellut lepakoiden käsittelyä kokeneen lepakorengastajan opastuksessa ja lintujen irrottamista verkoista linturengastajan opastuksessa. Rengastaminen tulee tehdä lepakoiden synnytys- ja imetyskauden (15.6.–15.7.) ulkopuolella eikä horrostavia lepakoita saa rengastaa (Luonnontieteellinen keskusmuseo 2015). Uloste- ja

anaalipyyhkäisy näytteiden keruu tätä tutkimusta varten tapahtui lepakoiden rengastustoiminnan yhteydessä lepakkorengastusluvallisten toimesta tai heidän valvonnassaan (erityisluvut POSELY/501/07.01/2010, UUDELY/475/07.01/2011, VARELY/433/07.01/2011, EPOELY/2239/2014, EPOELY/2292/2014, KASELY/1022/2014, POKELY/585/07.01/2014, UUDELY/3001/2014, VARELY/948/2014 ja HAMELY/1190/2015). Näytteiden keruupaikat on koottu oheiseen taulukkoon (Taulukko 2) ja sijainnit on esitetty oheisella kartalla (Kuva 1).

Taulukko 2 Näytteiden keruupaikat kussakin näytetyypissä ja kerättyjen näytteiden lukumäärät.

Eliömaakunta	Kunta	Ulostenäytteet	Anaalipyyhkäisy näytteet	Päivehtimispaikka näytteet
Varsinais-Suomi (Ab)	Kaarina	4	-	-
	Lieto	-	-	1
	Naantali	1	-	-
	Salo	-	-	14
	Vihti	4	-	-
Etelä-Karjala (Ka)	Imatra	1	-	-
Pohjois-Karjala (Kb)	Kitee	3	-	-
	Kontiolahti	4	-	-
Uusimaa (N)	Espoo	12	7	-
	Helsinki	18	5	-
	Kirkkonummi	10	8	8
	Raasepori	-	5	-
	Siuntio	2	10	5
Etelä-Pohjanmaa (Oa)	Mustasaari	10	-	-
Pohjois-Savo (Sb)	Joroinen	1	-	-
Satakunta (St)	Eurajoki	-	3	-
Etelä-Häme (Ta)	Hämeenlinna	7	-	-



Kuva 1 Näytteiden keruupaikat. Ulostennäytteet merkitty risteillä, anaalipyyhkäisynäytteet ympyröillä ja päivehtimispaikkanaäytteet kolmioilla.

Pyydyksistä irrotetut lepakot laitettiin odottamaan käsittelyä erillisiin kangaspusseihin. Pussissa odottamisen ja käsittelyn aikana ulostetut papanat kerättiin 1,5 ml mikrosentrifuugiputkiin, jotka sisälsivät RNAlater-liuosta (QIAGEN, Saksa). Niiltä vuoden 2013 lepakoilta, joilta ei heti saatu ulostenäytettä, kerättiin anaalipyyhkäisynäytteet vanupuikoilla, jotka myös säilöttiin RNAlater-liuokseen. Lepakoista kirjattiin ylös ainakin laji, sukupuoli, ikä (nuori, esiakuinen, aikuinen), pyydystyspäivämäärä, pyydystyspaikka, pyydystystapa sekä renkaan numero. Joistain lepakoista kerättiin sekä anaalipyyhkäisy- että ulostenäyte. Näiden näytteiden materiaali on käytännössä samanlaista, mutta ne käsitellään tutkielmassa kahtena eri näytetyyppinä, koska anaalipyyhkäisynäytteisiin saatavat ulostemäärät ovat paljon pienempiä kuin varsinaisissa ulostenäytteissä ja se saattaa pienentää virusten havaitsemisen todennäköisyyttä.

Lepakonpönttöjen ja muiden päivehtimispaikkojen tutkimisen yhteydessä kerättiin päivehtivien lepakoiden alta useita papanoita RNAlater-liuosputkiin. Lisäksi kirjattiin ylös päivehtivien lepakoiden havaittu tai oletettu laji, keräyspäivä ja paikka.

Vuosien 2013 ja 2014 näytteistä RNA eristettiin Eivassa käyttäen QIAamp Viral RNA Mini Kit -pakettia (QIAGEN, Saksa). Vuoden 2015 näytteistä RNA eristettiin Helsingin yliopiston Haartman-instituutin

virologian osastolla ja 2016 näytteistä Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan Eläinlääketieteellisten biotieteiden osastolla käyttäen TriPure-reagenssia (Roche, Sveitsi) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Yksi tai useampi ulostepapana siirrettiin laminaarissa puhtaita välineitä käyttäen TriPure-liuokseen, jossa papana hajotettiin vorteksoimalla käyttäen apuna steriilejä lasikuulia ja hiekkaa. Eristyksen jälkeen RNA liuotettiin 50 µl tilavuuteen ja jaettiin viiteen 10 µl alikvaattiin.

2.2 RT-QPCR JA RT-PCR –MENETELMÄT SEKÄ SEKVENSOINTI

Evirassa seulottiin ja varmistettiin vuosien 2013 ja 2014 näytteet, Helsingin yliopistolla zoonosivirologian laboratorioissa taas vuosien 2015 ja 2016 näytteet. Kaikista näytteistä seulottiin koronaviruksia. Eviralla näytteet seulottiin ja varmistettiin OneStep RT-PCR kit (QIAGEN) -pakettilla. Paramyksenoviruksia seulottiin vain vuosien 2015 ja 2016 näytteistä. Yliopistolla jokainen näyte oli jäädytetty ja sulatettu ennen PCR-reaktioita korkeintaan kerran. Alukkeet tilattiin yliopistolle Oligomerilta (Helsinki, Suomi). Kaikki tutkimuksessa käytetyt alukkeet on suunniteltu sitoutumaan virusten genomien konservoituneille alueille: koronavirusten alukkeet sitoutuvat viruksen RNA-replikaasia (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) koodaavalle alueelle ja paramyksenovirusten alukkeet viruksen RNA-polymeraasi (L-proteiini) koodaavalle alueelle. Sekä Meilahden että Viikin laboratorioissa tehdyissä näytteiden seulonnoissa käytettiin samanlaisia Stratagen Mx3005P (Agilent Technologies, Yhdysvallat) -laitteita ja qScript One-Step SYBR Green qRT-PCR Kit, Low ROX -entsyymejä (Quanta Biosciences, Yhdysvallat). Reaktioliuokset ja PCR-ohjelmat löytyvät tutkielman liitteistä (Liite 7.1).

2.2.1 RT-qPCR-seulontamenetelmien alukkeet

Koronavirusten seulonnassa Evirassa käytettiin aiemmin julkaistuja alukkeita ja yliopistolla samoja, joskin hieman muutettuja, alukkeita (Muradrasoli ym. 2009). Alukkeesta 13-RW puuttui yliopistolla viimeinen emäs (C). Positiivikontrollit monistuiivat myös tällä alukkeella, joten aluketta ei tarvinnut tilata uudestaan. Yliopistolla käytetyt alukkeet olivat seuraavat:

```
11-FW: 5' TGA TGA TGS NGT TGT NTG YTA YAA 3'  
13-RW: 5' GCA TWG TRT GYT GNG ARC ARA ATT 3'
```

Paramyksenovirusten seulonnassa käytettiin aiemmin julkaistujen alukkeiden muokattuja versioita (Tong ym. 2008). Aluketta PAR-F1 muokattiin alukkeiden julkaisun jälkeen löydettyjen UMRV-ryhmään (Unclassified Morbilli-related paramyxoviruses) luokiteltujen paramyksenovirusten sekvenssien perusteella (GenBank-tunnisteet: KC154054.1, AB844391.1, AB844384.1, AB844378.1, AB844413.1, AB844388.1, AB844367.1, AB844406.1, AB844398.1, AB844376.1, AB844358.1, AB844427.1, AB844422.1, AB844426.1, AB844341.1, AB844346.1, AB844345.1). Yksi sekvensseistä on peräisin lepakosta eristetyistä viruksesta ja loput 16 jyrksijöistä eristetyistä viruksista. Sekvenssit ja PAR-F-aluke rinnastettiin käyttäen BioEdit (versio 7.2.5) -

ohjelman sisällytettyä ClustalW (versio 1.4) -ohjelmaa ja alukkeen emäksiä muutettiin spesifisiksi tai epäspesifisiksi rinnastuksen perusteella (Thompson ym. 1994, Hall 1999). Aluketta PAR-R ei muokattu. Alukkeet olivat seuraavat:

qPAR-F: 5' GAR GGX TAY WGT CAR AAR TTR TGG AC 3'
qPAR-R: 5' GCT GAA GTT ACN GGN TCN CCD ATR TTN C 3'

2.2.2 RT-qPCR-seulontamenetelmien optimointi

Koronaviruksia tunnistava RT-qPCR -seulontamenetelmä optimoitiin käyttämällä HUSLABista Anne Jääskeläiseltä saatuja anonyymeja RNA-potilasnäytteitä, joista oli tutkittu hengitystieinfektioita aiheuttavia viruksia. Zoonoosivirologian laboratoriolle on lupa käsitellä tällaisia näytteitä, ja ainoat tiedot, jotka näytteistä minulle luovutettiin, olivat näytteiden numerot näytejonossa, diagnostisen koronavirus-PCR:n tulokset sekä virusmäärät positiivisissa näytteissä. Paramykosviruksille ei löytynyt vastaavaa näytesarjaa, mutta menetelmä testattiin samoilla näytteillä ristireaktiivisuuden poissulkemiseksi. Potilasnäytteitä oli yhteensä 74 kappaletta, joista kolme oli positiivisia ihmisten koronavirusille. Näistä kaksi oli positiivisia alfa-koronaviruksiin kuuluvalla NL63-kannalle ja yksi beeta-koronaviruksiin kuuluvalla OC43-kannalle. Lisäksi potilasnäytteiden mukana toimitettiin yhdistettyjä positiivikontrolleja, joista yksi sisälsi sekä OC43-koronavirusta että RSV-paramykosvirusta. Koronavirusten positiivikontrolleina käytettiin RNA-eristyskansi MERS-, OC43- ja NL63-koronaviruskannoista. Näistä ensimmäinen oli peräisin soluviljelmästä ja kaksi jälkimmäistä potilasnäytteistä. Paramykosvirusten RT-qPCR-seulontamenetelmän positiivikontrolleina käytettiin RNA-eristyskansi tuhkarokko- ja penikkatautiviruksista. Molemmat olivat peräisin soluviljelmästä. Lisäksi paramykosvirusten seulontamenetelmää testattiin potilasnäytteiden RSV-positiivikontrollilla. MERS-koronaviruksen ja tuhkarokkoviruksen käsittely oli aloitettu BSL-3 -tason turvalaboratoriossa, josta näytteet siirrettiin laboratorion ulkopuolelle TriPure-eristysliuoksessa, jolloin virukset eivät enää ole infektiivisiä. Valmiiksi eristetyt OC43- ja NL63-RNA:t eivät ole infektiivisiä eikä penikkatautivirus tartu ihmiseen. Kaikkia positiivikontrolleja voitiin siis käsitellä normaalissa laboratorioympäristössä.

Koronavirusten RT-qPCR-seulontamenetelmä monisti heikosti OC43-positiivisiksi todettuja näytteitä, mutta menetelmää päätettiin käyttää, koska se monisti muut positiivikontrollit onnistuneesti. Paramykosvirusten RT-qPCR-seulontamenetelmä ei pystynyt monistamaan RSV-kontrollinäytettä, mutta kaksi muuta positiivikontrollia monistuivat onnistuneesti.

2.2.3 Seulonnassa positiivisiksi todettujen näytteiden varmentaminen

Yliopistolla tehdyissä RT-qPCR-seulunnoissa positiivisiksi todettujen näytteiden RNA käännettiin cDNA:ksi RevertAid Premium -entsyymillä (ThermoFisher Scientific, Yhdysvallat) käyttäen kuuden satunnaisten emäksen alukkeita (random hexamer primers).

Eviralla koronavirukset varmistettiin aiemmin julkaistuilla ja hieman muokatuilla alukkeilla (5'ggg tgg gac tat cct aag tgt g3' ja 5'cat cat cag ata gaa tca tca t3') (Woo ym. 2006). Yliopistolla koronavirukset varmistettiin aiemmin julkaistulla ja hieman muokatulla nested RT-PCR -menetelmällä käyttäen Phusion Flash II DNA Polymerase -entsyymiä (ThermoFisher Scientific, Yhdysvallat) (De Souza Luna ym. 2007). Nested-PCR -menetelmässä näyte monistetaan ensin yhdessä reaktiossa, jonka jälkeen ensimmäisen reaktion tuotetta monistetaan toisessa reaktiossa. Toisen reaktion alukkeet tarttuvat sellaisiin kohtiin, jotka löytyvät ensimmäisen reaktion monistaman alueen sisältä. Koronavirusten varmistamisessa käytetyn RT-PCR-menetelmän alukkeet olivat seuraavat:

```
PC2S2a: 5' TTA TGG GTT GGG ATT ATC 3'
PC2S2b: 5' TGA TGG GAT GGG ACT ATC 3'
PC2As1a: 5' TCA TCA CTC AGA ATC ATC A 3'
PC2As1b: 5' TCA TCA GAA AGA ATC ATC A 3'
PC2As1c: 5' TCG TCG GAC AAG ATC ATC A 3'
PCSa: 5' CTT ATG GGT TGG GAT TAT CCT AAG TGT GA 3'
PCSB: 5' CTT ATG GGT TGG GAT TAT CCC AAA TGT GA 3'
PCNAs: 5' CAC ACA ACA CCT TCA TCA GAT AGA ATC ATC A 3'
```

Paramykovirukset varmistettiin aiemmin julkaistulla heminested-RT-PCR -menetelmällä (Tong ym. 2008).

Menetelmä muistuttaa nested-RT-PCR -menetelmää, mutta toinen toisessa reaktiossa käytetyistä alukkeista on sama kuin ensimmäisessä reaktiossa. Alukkeet olivat seuraavat:

```
PAR-F1: 5' GAA GGN TAT TGT CAN AAR NTN TGG AC 3'
PAR-F2: 5' GTT GCT TCA ATG GTT CAR GGN GAY AA 3'
PAR-R: 5' GCT GAA GTT ACN GGN TCN CCD ATR TTN C 3'
```

Sekä koronavirusten että paramykovirusten RT-PCR-reaktioiden lopputuotteista ajettiin näytteet 2 % vahvuisille agarosigeleille. Positiivisiksi todettiin ne näytteet, joissa oli monistunut samanpituisia lopputuotteita kuin positiivikontrolleilla. Koronaviruksilla tämä pituus oli noin 500 nt (nukleotidia) ja paramykoviruksilla noin 600 nt ja 700 nt. Positiivisiksi todetuista reaktioista puhdistettiin sekvensointinäytteet Exonuclease I -entsyymillä FastAP-puskurissa (ThermoFisher Scientific, Yhdysvallat) valmistajan ohjeen mukaisesti. Koronavirusten sekvensointinäytteet lähetettiin Suomen molekyyli lääketieteen instituutin (FIMM) sekvensointilaboratorioon sekvensoitavaksi alukkeilla PCSa, PCSb ja PCNAs. Sekvensointi tehtiin BigDye v.3.1 -kitillä, elektroforeesi ABI3730xl DNA Analyzer -laitteella ja emästen tunnistaminen Sequencing Analysis 5.2 -ohjelmalla. Paramykoviruksia ei näytteistä löydetty, eli niitä ei sekvensoitu.

2.3 TILASTOLLISET MENETELMÄT

Pienestä näytekoosta huolimatta pyrin tekemään aineistosta tilastollisia mallinnuksia tutkimuskysymyksiin vastaamista varten. Analyysit tehtiin ulostenäytteille, koska niitä oli eniten tutkituista näytetyypeistä. Aineistosta karsittiin ne näytteet, joista oli toimitettu puutteelliset laboratoriotulokset tai joiden kohdalla esiintyi eroja kenttä- ja laboratorikirjanpidon välillä, koska niiden kohdalla olisi pitänyt tehdä oletuksia näytteiden alkuperästä ja nämä oletukset olisivat vaikuttaneet mallinnusten tuloksiin. Näytteet on kerätty tilanteen salliessa eivätkä keräyspaikat ole jakautuneet tasaisesti eteläiseen Suomeen, eli näytteiden välillä on spatiaalista korrelaatiota. Lisäksi näytteitä on kerätty eri paikoista eri vuosina. Näytteet eivät siis ole toisistaan riippumattomia ja niiden sisällä on maantieteellistä ja ajallista rakennetta, joten hypoteesien tilastolliseen testaamiseen käytettiin yleistettyjä lineaarisia sekamalleja, joissa nämä rakenteet voidaan huomioida satunnaistekijöinä. Vastemuuttujana on viruksen esiintyminen, jolloin lepakko joko kantaa tai ei kanna virusta, eli kyseessä on logistinen regressiomalli. Aineisto käsiteltiin kahdella eri mallilla, joista toisessa huomioitiin spatiaalinen korrelaatio käyttämällä satunnaistekijänä näytteen keräyskuntaa ja toisessa huomioitiin ajallinen rakenne käyttämällä satunnaistekijänä näytteen keräysvuotta. Malleissa huomioitiin tutkimuskysymyksissä mainittujen tietojen eli lepakon ikäryhmän, näytteen keräyskuukauden ja eliömaakunnan lisäksi lepakon laji. Kaikkia mallin muuttujia käsiteltiin luokkamuuttujina.

Molempien sovitettujen mallien rakenne oli seuraava:

$$L_i = \text{ikäryhmä}_i + \text{keräyskuukausi}_i + \text{eliömaakunta}_i + \text{lepakkolaji}_i \quad (1)$$

$$y_i \sim \text{Ber}(\text{logit}^{-1}(L_i + a_{p(i)}))$$

$$a_p \sim N(0, \sigma_p^2)$$

Jossa: i = havainnon indeksi

y_i = havainnon vastemuuttujan arvo

a_p = satunnaistekijän arvo

σ_p^2 = satunnaistekijän varianssi

Ensimmäisessä mallissa satunnaistekijänä a_p käytettiin näytteen keräyskuntaa ja toisessa näytteen keräysvuotta. Tilastolliset analyysit tehtiin R (3.1.3) -ohjelmiston paketilla lme4 (1.1-10) (Bates ym. 2015, R Core Team 2015).

2.4 FYLOGENEETTISET MENETELMÄT KORONAVIRUSSEKVENSSILLE

Sekvenssejä käsiteltiin BioEdit (7.2.5) ja R (3.1.3) -ohjelmistoilla (Hall 1999, R Core Team 2015). Sekvenssit rinnastettiin Muscle (3.8.31) –ohjelmalla ja fylogeneettiset analyysit suoritettiin käyttäen Maximum Likelihood -menetelmää RAxML-ohjelmalla (8.1.3) ja Bayesilaista menetelmää MrBayes-ohjelmalla (3.2.6 x64) (Edgar 2004, Ronquist ym. 2012, Stamatakis 2014).

Analyysissa käytetyt muut lepakkovirussekvenssit ja sekvenssien nimet noudettiin GenBank-viitenumeroitten (Accession numbers) perusteella käyttäen R-ohjelman ape (3.4) -pakettia (Paradis ym. 2004, Popescu ym. 2012). GenBank-tietokannasta noudetut sekvenssit valittiin lähteinä käytettyjen julkaisujen avulla ja ne löytyvät tutkielman liitteestä (Liite 7.2). Sekvenssejä valittaessa pyrittiin laajaan maantieteelliseen kattavuuteen ja lepakoiden osalta isäntälajien monimuotoisuuteen. Käytin sekvenssien lataukseen R-pakettia, koska analyysijä tehtäessä GenBank nimesi selainkäyttöliittymän kautta ladatut sekvenssit muodossa, jossa sekvenssien nimet olivat liian pitkiä osalle käytettäviä ohjelmistoja ja nämä nimet sisälsivät epäolennaista tietoa. Selainkäyttöliittymää on sittemmin paranneltu eikä R-paketin kautta tehtävä lataus ole enää tulevaisuudessa välttämättä tarpeellista. Analysoitavia sekvenssejä oli yhteensä 117 kappaletta, joista 7 oli Suomessa tässä tutkimuksessa sekvensoituja. Yksi näistä sekvensseistä edusti kahta identtistä näytettä (vi416/2014 ja vi606/2014).

Aluksi sekvensseistä, jotka olivat pidempiä kuin sekvenssi DQ074652.1 *Tylonycteris_bat_coronavirus_HKU4* (2801 nukleotidia), leikattiin analyysien nopeuttamiseksi tämän mallisekvenssin ylittävät alueet.

Lyhennettäviä sekvenssejä oli yhteensä 36 kappaletta ja ne on merkitty liitteenä olevaan taulukkoon (Liite 7.2). Pitkät sekvenssit ja mallisekvenssi rinnastettiin BioEdit-ohjelmassa käyttäen ohjelmaan sisällytettyä ClustalW-ohjelmaa (1.4) oletusasetuksilla (Thompson ym. 1994). Rinnastuksen jälkeen mallisekvenssin ylittävät osat leikattiin pois ja lyhennetyt sekvenssit palautettiin muiden sekvenssien joukkoon.

Kaikki sekvenssit rinnastettiin käyttämällä Muscle-ohjelmaa oletusasetuksilla. Rinnastetuista sekvensseistä poistettiin heikosti rinnastuneet ja suurimmasta osasta sekvenssejä puuttuneet alku- ja loppuosat siten, että jäljelle jäivät konservoituneet nukleotidit väliltä 1968-2222 eli 255 nukleotidia.

Fylogeneettisissa analyyseissa käytettävä evolutiivinen malli valittiin MEGA7 (7.0.21) –ohjelman suurimman todennäköisyyden (Maximum Likelihood) mallinvalintatyökalulla 24 substituutiomallin joukosta (Taulukko 3) (Kumar ym. 2016). Sekä BIC- että AICc-arvojen perusteella aineistoon sopivin malli on GTR+G (General Time Reversible model + Gamma). Tässä mallissa nukleotidimuutosten todennäköisyys arvioidaan erikseen jokaiselle nukleotidimuutosvaihtoehdolle, mutta nämä todennäköisyydet muuntelevat kussakin sekvenssin kohdassa gammajakauman mukaisesti.

Taulukko 3 Suurimman todennäköisyyden (Maximum Likelihood) sovitukset 24 erilaisesta nukleotidisubstituutiomallista. Mallit, joilla on matalimmat BIC arvot (Bayesian Information Criterion), ovat parhaita kuvaamaan substituutiotapahtumia. Jokaiselle mallille on esitetty parametrien lukumäärä (sisältäen fylogeneettisen puun haarojen pituudet), AICc arvot (Akaike Information Criterion, corrected) ja Maximum Likelihood -arvot (lnL). Fylogeneettisen puun topologia laskettiin automaattisesti ML-arvojen estimoimiseksi. Analyysiin käytettiin 117 sekvenssiä. Kodonisijainneista huomioitiin 1+2+3+”ei-koodaava”. Rinnastuksesta poistettiin sijainnit, joissa oli aukkoja tai puuttuvaa dataa. Lopullisessa rinnastuksessa oli yhteensä 253 sijaintia. Lyhenteet: GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor.

Malli	Parametrien lkm	BIC	AICc	lnL
GTR+G	240	22082,29908	20095,30391	-9805,681928
GTR+G+I	241	22094,56215	20099,30439	-9806,665684
TN93+G+I	238	22134,77	20164,30044	-9842,212953
T92+G+I	235	22146,42435	20200,74423	-9863,483472
HKY+G+I	237	22163,75128	20201,54473	-9861,851374
TN93+G	237	22166,28837	20204,08182	-9863,119921
HKY+G	236	22178,37234	20224,42894	-9874,309687
T92+G	234	22183,86456	20246,44787	-9887,35136
K2+G+I	234	22328,74623	20391,32954	-9959,792195
K2+G	233	22365,74775	20436,59462	-9983,440735
JC+G+I	233	23072,97631	21143,82318	-10337,05501
JC+G	232	23095,1765	21174,28707	-10353,30289
GTR+I	240	23451,10319	21464,10803	-10490,08399
TN93+I	237	23466,2143	21504,00775	-10513,08288
T92+I	234	23557,41333	21619,99663	-10574,12574
HKY+I	236	23618,99055	21665,04714	-10594,61879
K2+I	233	23626,38671	21697,23358	-10613,76022
JC+I	232	24262,51902	22341,6296	-10936,97416
GTR	239	24878,7239	22899,99147	-11209,04212
TN93	236	24889,78729	22935,84388	-11230,01716
T92	233	24991,54131	23062,38818	-11296,33752
K2	232	25004,5295	23083,64007	-11307,97939
HKY	235	25075,12948	23129,44936	-11327,83604
JC	231	25620,49123	23707,86565	-11621,10804

RAxML-analyysi suoritettiin CSC:n Taito-shell –ohjelmistoserverillä. Puun haarojen luotettavuuksien arviointia varten aineistosta tehtiin bootstrap-analyysi 1000 toistolla. Sekä ML- että bootstrap-analyysit ajettiin seuraavalla komennolla:

```
raxmlHPC -n gradu_sekvenssit -s gradu_sekvenssit_muscle_leikattu.fasta -m GTRGAMMA -p 43527 -f a -x 863 -p 137 -N 1000
```

Rinnastetut sekvenssit muutettiin nexus-muotoon MrBayes-analyysia varten käyttäen PhyDE (0.9971) –ohjelmaa (Müller ym. 2010). Analyysi tehtiin 1 000 000 kertaa ja joka tuhannes analyysi tallennettiin, minkä jälkeen 25 % alun tuloksista poistettiin burn-in -tuloksina. Analyysi ajettiin kotitietokoneella seuraavalla komentotiedostolla:

```

begin mrbayes;
  set autoclose=yes nowarn=yes;
  execute gradu_sekvenssit_muscle_leikattu.nex;
  lset nst=6 rates=gamma;
  mcmc nchains=4 nruns=2 ngen=1000000 samplefreq=1000 printfreq=1000
diagnfreq=1000;
  sump;
  sumt;
end;

```

Valmiit fylogeneettiset puut viimeisteltiin esitysmuotoon FigTree (1.4.3) –ohjelmalla (Rambaut 2016).

Molemmissa puissa juuri sijoitettiin midpoint root -menetelmällä kahden toisistaan etäisimmän taksonin puoliväliin, jolloin aikaisemmin julkaistuihin tuloksiin verrattaessa puiden juuret asettuivat alfa- ja beetakoronavirusten väliin.

2.5 KARTAT

Tutkielman kartta (Kuva 1) on tehty R-ohjelmiston (3.1.3) paketeilla sp (1.2-3), maptools (0.8-39), maps (3.1.0) ja GISTools (0.7-4) (Pebesma ja Bivand 2005, Bivand ym. 2013, Brunsdon ja Hongyan 2014, R Core Team 2015, Becker ym. 2016, Bivand ja Lewin-Koh 2016). Valtioiden rajat ovat paketista maps ja järvien muodot Suomen ympäristökeskuksen tuottamasta EU:n vesipuitedirektiivin mukaisesta pintavesimuodostuma ESRI shapefile -aineistosta (vpd_vesimuodostumat, 2014; Lähde: SYKE, ELY-keskukset).

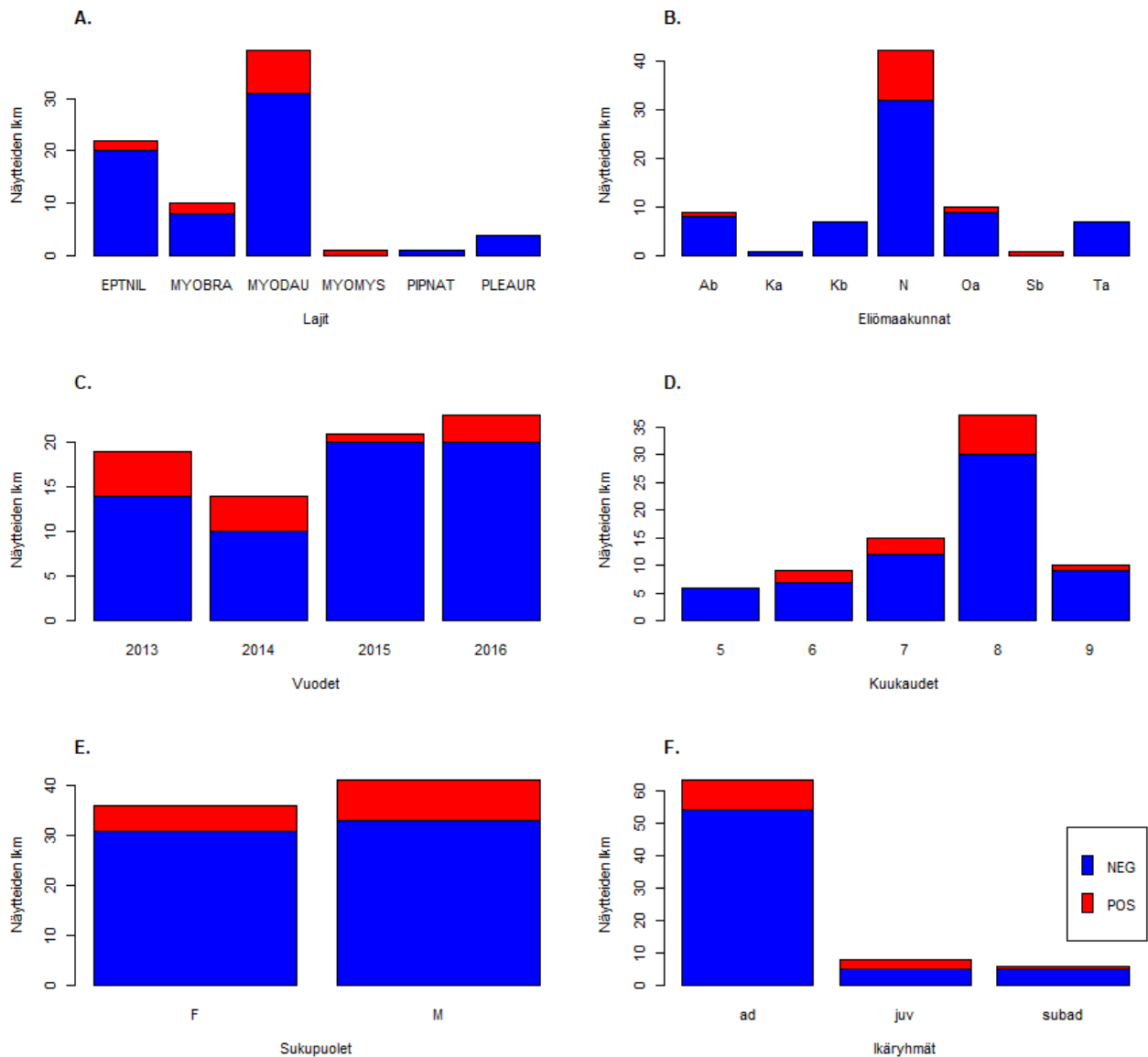
3 TULOKSET

3.1 POSITIIVISET LÖYDÖKSET

Tutkimuksessa saatiin tulokset 77 ulostenäytteestä, joista 13 oli positiivisia koronaviruksille (Taulukko 4, Kuva 2).

Taulukko 4 Ulostenäytteet vuosilta 2013–2016 lepakkolajeittain ja eliömaakunnittain. Vasen luku on koronaviruspositiivisten näytteiden määrä ja oikea luku näytteiden kokonaismäärä.

Lepakkolaji	Varsinais-Suomi (Ab)	Etelä-Karjala (Ka)	Pohjois-Karjala (Kb)	Uusimaa (N)	Etelä-Pohjanmaa (Oa)	Pohjois-Savo (Sb)	Etelä-Häme (Ta)	Yhteensä
Pohjanlepakko <i>Eptesicus nilssonii</i>	0/4	-	0/3	1/8	0/4	1/1	0/2	2/22
Isoviiksisiippa <i>Myotis brandtii</i>	-	-	0/1	2/7	0/1	-	0/1	2/10
Vesisiippa <i>Myotis daubentonii</i>	1/5	0/1	0/3	6/22	1/4	-	0/4	8/39
Viiksisiippa <i>Myotis mystacinus</i>	-	-	-	1/1	-	-	-	1/1
Pikkulepakko <i>Pipistrellus nathusii</i>	-	-	-	-	0/1	-	-	0/1
Korvayökkö <i>Plecotus auritus</i>	-	-	-	0/4	-	-	-	0/4
Yhteensä	1/9	0/1	0/7	10/42	1/10	1/1	0/7	13/77

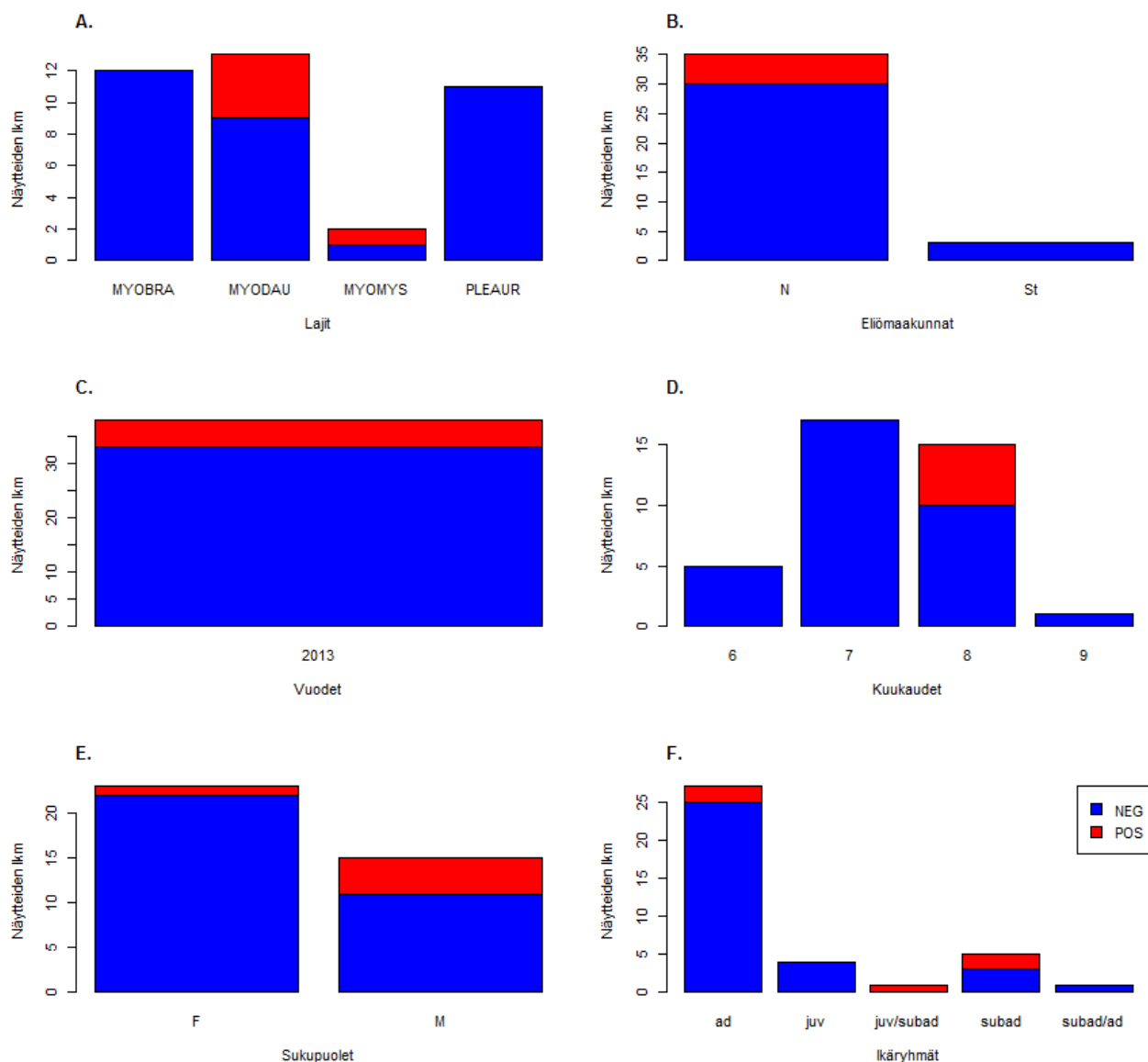


Kuva 2 Ulostenäytteet vuosilta 2013–2016. Kuvassa ulostenäytteet jaoteltuna A) isäntälajien (EPTNIL = pohjanlepakko, MYOBRA = isoviiksisiippa, MYODAU = vesisiippa, MYOMYS = viiksisiippa, PIPNAT = pikkulepakko, PLEAUR = korvayökkö), B) eliömaakuntien (lyhenteiden selitykset taulukossa 3), C) keräysvuosien, D) keräyskuukausien, E) isännän sukupuolten (F = naaras, M = koiras) ja F) isännän ikäryhmien (ad = aikuinen, juv = nuori, subad = esiaikuinen) mukaisesti. Pylvään korkeus kuvaa näytteiden kokonaismäärää, sininen osuus negatiivisia näytteitä ja punainen osuus koronaviruspositiivisia näytteitä.

Anaalipyyhkäisynäytteitä tutkittiin yhteensä 38 kappaletta, joista 5 oli positiivisia koronaviruksille (Taulukko 5, Kuva 3). Kaksi näytteistä oli samoista yksilöistä, joista oli tutkittu myös ulostenäytteet vuonna 2013 ja molemmissa tapauksissa molemmat näytetyypit olivat positiivisia koronaviruksille.

Taulukko 5 Anaalipyyhkäisynäytteet vuodelta 2013 lepakkolajeittain ja eliömaakunnittain. Vasen luku on koronaviruspositiivisten näytteiden määrä ja oikea luku näytteiden kokonaismäärä.

Lepakkolaji	Uusimaa (N)	Satakunta (St)	Yhteensä
Isoviiksisiippa <i>Myotis brandtii</i>	0/11	0/1	0/12
Vesisiippa <i>Myotis daubentonii</i>	4/11	0/2	4/13
Viiksisiippa <i>Myotis mystacinus</i>	1/2	-	1/2
Korvayökkö <i>Plecotus auritus</i>	0/11	-	0/11
Yhteensä	5/35	0/3	5/38

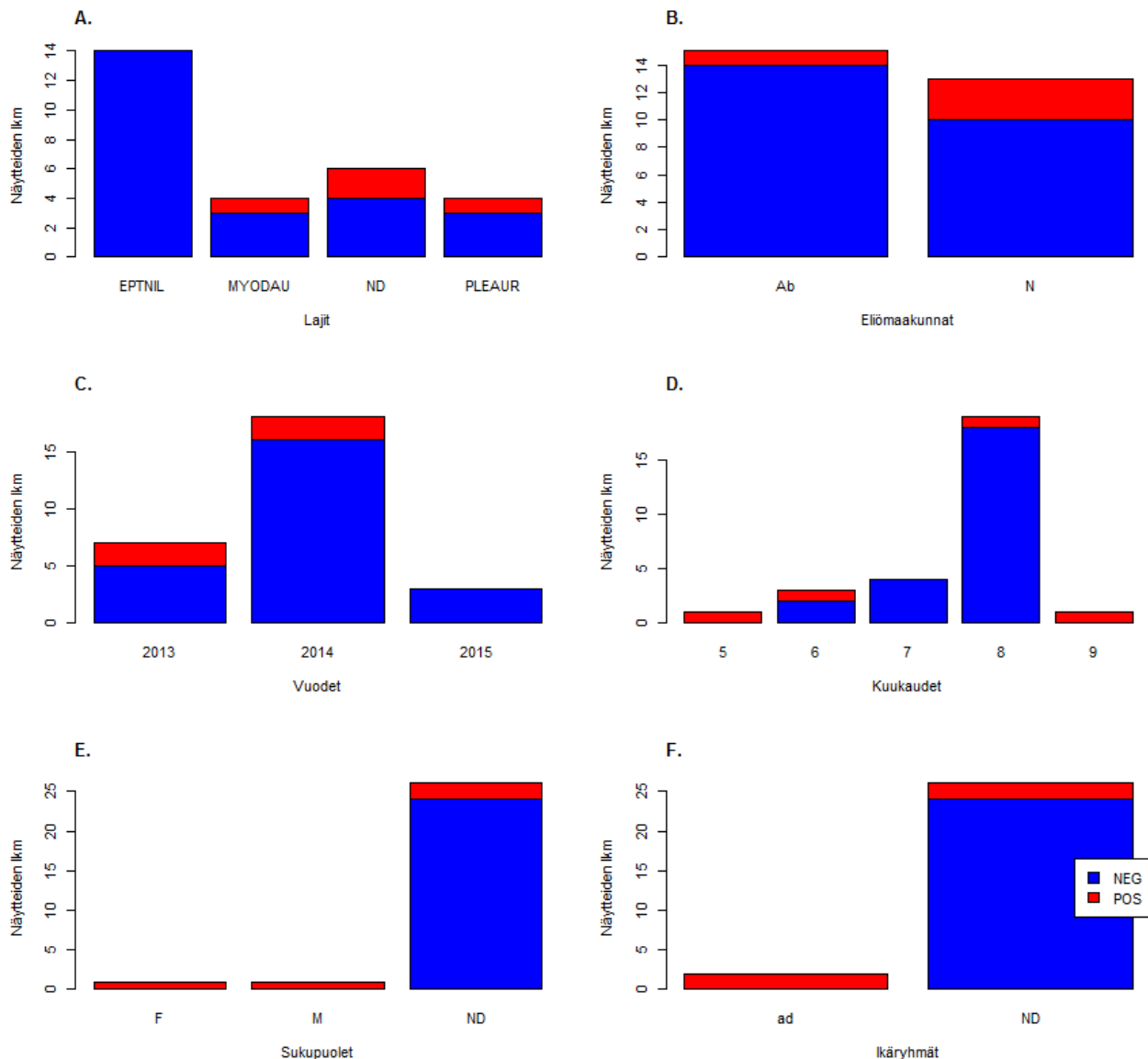


Kuva 3 Anaalipyyhkäisynäytteet vuodelta 2013. Kuvassa ulostenäytteet jaoteltuna A) isäntälajien (MYOBRA = isoviiksisiippa, MYODAU = vesisiippa, MYOMYS = viiksisiippa, PLEAUR = korvayökkö), B) eliömaakuntien (lyhenteiden selitykset taulukossa 3), C) keräysvuoden, D) keräyskuukausien, E) isännän sukupuolten (F = naaras, M = koiras) ja F) isännän ikäryhmien (ad = aikuinen, juv = nuori, subad = esiaikuinen) mukaisesti. Pylvään korkeus kuvaa näytteiden kokonaismäärää, sininen osuus negatiivisia näytteitä ja punainen osuus koronaviruspositiivisia näytteitä.

Päivehtimispaikkanäytteitä tutkittiin yhteensä 28 kappaletta, joista 4 oli koronaviruspositiivisia (Taulukko 6, Kuva 4). Taulukossa esitetyt lajit ovat lepakkotutkijoiden oletuksia lajeista, joista näytteet ovat peräisin.

Taulukko 6 Ulostenäytteet päivehtimispaikoilta vuosilta 2013–2015 lepakkolajeittain ja eliömaakunnittain. Vasen luku on koronaviruspositiivisten näytteiden määrä ja oikea luku näytteiden kokonaismäärä.

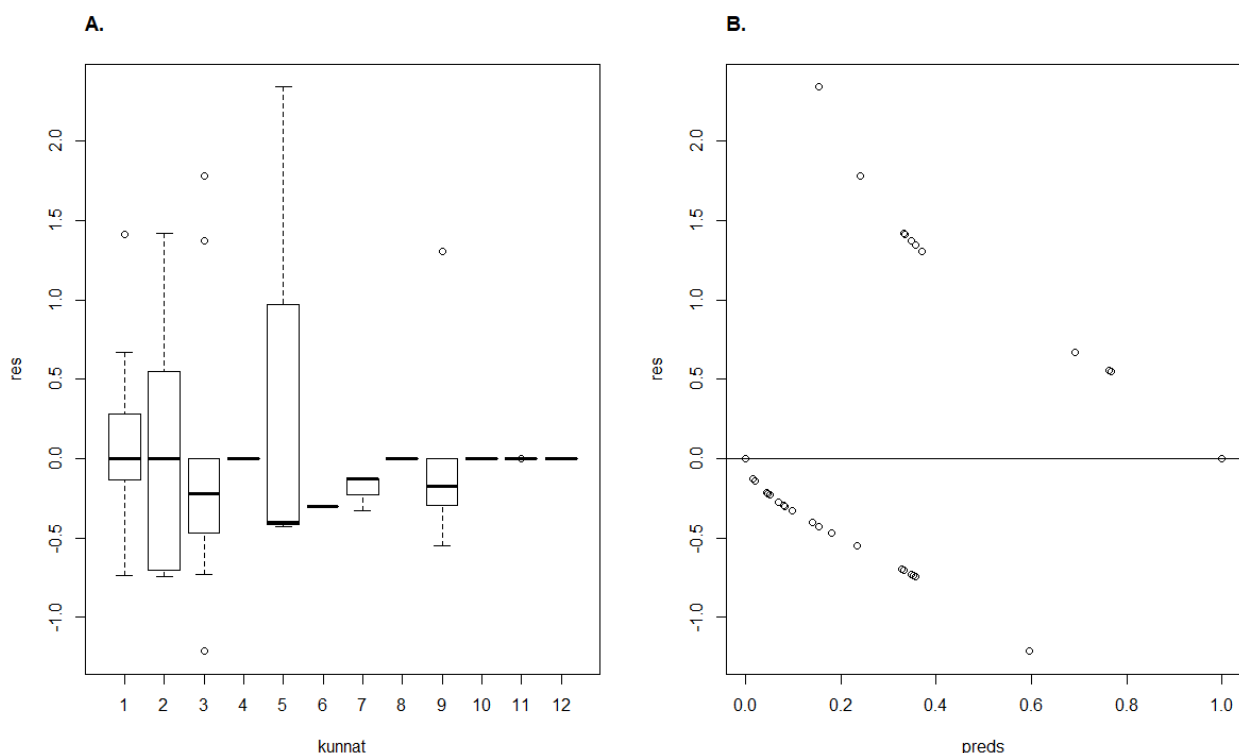
Lepakkolaji	Varsinais-Suomi (Ab)	Uusimaa (N)	Yhteensä
Pohjanlepakko <i>Eptesicus nilssonii</i>	0/14	-	0/14
Vesisiippa <i>Myotis daubentonii</i>	-	1/4	¼
Korvayökkö <i>Plecotus auritus</i>	-	1/4	¼
Määrittämätön laji	1/1	1/5	2/6
Yhteensä	1/15	3/13	4/28



Kuva 4 Ulostenäytteet päivehtimispaikoilta vuosilta 2013–2015. Kuvassa ulostenäytteet jaoteltuna A) isäntälajien (EPTNIL = pohjanlepakko, MYODAU = vesisiippa, ND = määrittämätön, PLEAUR = korvayökkö), B) eliömaakuntien (lyhenteiden selitykset taulukossa 3), C) keräysvuosien, D) keräyskuukausien, E) isännän sukupuolten (F = naaras, M = koiras, ND = määrittämätön) ja F) isännän ikäryhmien (ad = aikuinen ND = määrittämätön) mukaisesti. Pylvään korkeus kuvaa näytteiden kokonaismäärää, sininen osuus negatiivisia näytteitä ja punainen osuus koronaviruspositiivisia näytteitä.

3.2 TILASTOLLISET ANALYYSIT

Ulostenäyteaineistosta sovitettiin kaksi logistista regressiomallia. Ensimmäisen sekamallin satunnaistekijänä käytettiin näytteen keräyskuntaa ($L_i \sim Ikä + KK + Eliömaakunta + Laji + (1 | Kunta)$). Mallin diagnostiikkakuvien perusteella mallin oletukset toteutuvat otoskoko suhteutettuna riittävän hyvin (Kuva 5). Mallin tuottamat estimaatit, keskihajonnat ja z- ja p-arvot löytyvät oheisesta taulukosta (Taulukko 7). Mikään tarkasteltujen muuttujien (lepakon ikäryhmä, näytteen keräyskuukausi, näytteen keruupaikan eliömaakunta tai lepakon laji) arvoista ei poikennut merkittävästi toisistaan (kaikkien p-arvot >0,05).

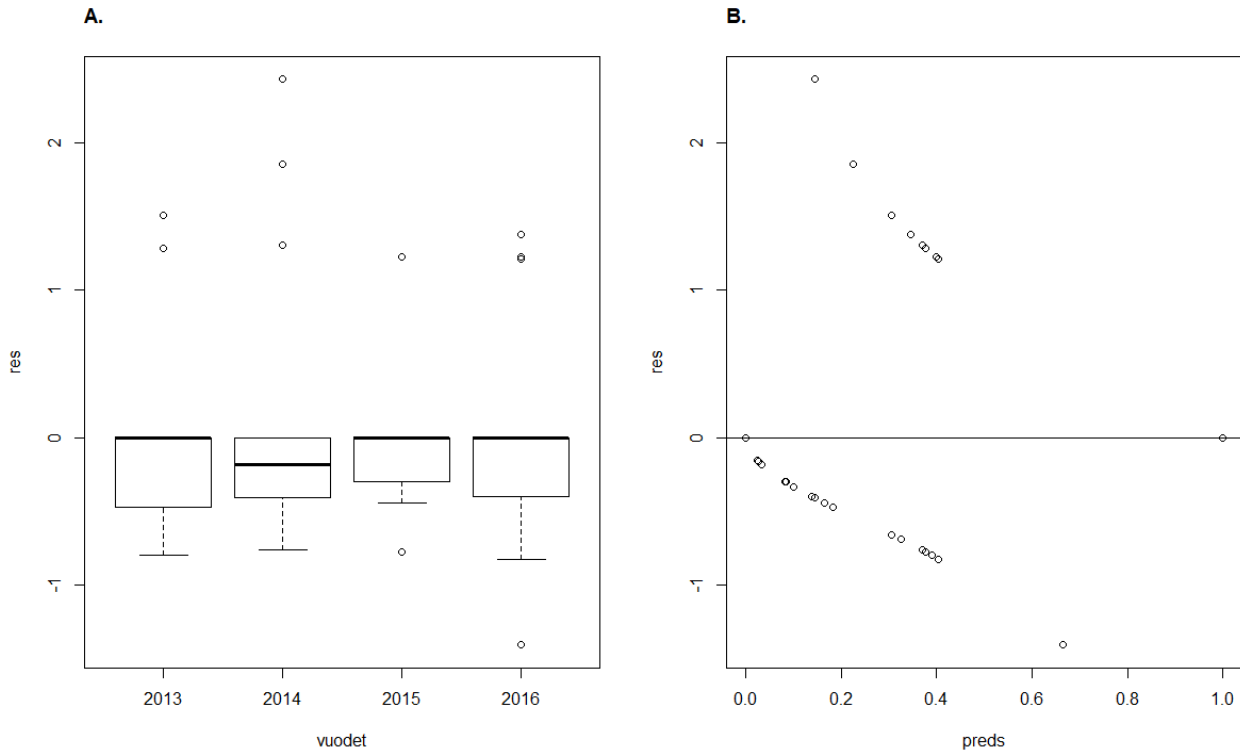


Kuva 5 Ensimmäisen mallin diagnostiset kuvat. A) Mallin residuaalien (res) jakautuminen eri kuntien välillä. Residuaalit ovat suurin piirtein samalla lailla jakautuneita eri kunnissa, mutta hajonta on joissain kunnissa hyvin suurta ja joissain olematonta. Tämä johtuu pienestä otoskoosta. B) Mallin ennustamien residuaalien (preds) suhde havaittuihin residuaaleihin (res). Näiden välillä ei ole havaittavissa liian suuria eroja.

Taulukko 7 Mallin $L_i \sim \text{Ikä} + \text{KK} + \text{Eliömaakunta} + \text{Laji} + (1 | \text{Kunta})$ estimoidut parametrit, keskihajonnat ja z- ja p-arvot. Satunnaistekijän (kunta) varianssin estimaatti on 1,457 (12 ryhmää).

	Estimaatti	Keskihajonta	z-arvo	p-arvo
(Kulmakerroin)	-21,0373	11695,7675	-0,002	0,999
IkäSubad	-22,2515	23083,3076	-0,001	0,999
IkäJuv	1,9036	1,2512	1,522	0,128
KK6	19,7534	11695,7675	0,002	0,999
KK7	19,6423	11695,7675	0,002	0,999
KK8	21,5376	11695,7675	0,002	0,999
KK9	22,4233	11695,7676	0,002	0,998
EliömaakuntaAb	-0,6478	1,8365	-0,353	0,724
EliömaakuntaSb	22,6112	41144,1155	0,000	1,000
EliömaakuntaOa	-2,6797	2,0171	-1,328	0,184
EliömaakuntaKb	-20,5819	6774,3664	-0,003	0,998
EliömaakuntaKa	-20,5300	17233,8680	-0,001	0,999
EliömaakuntaTa	-21,1113	18383,3855	-0,001	0,999
LajiMYODAU	-0,3652	1,3180	-0,277	0,782
LajiPLEAUR	-19,6748	14105,7181	-0,001	0,999
LajiMYOMYS	38,4529	23832,1580	0,002	0,999
LajiEPTNIL	-1,8700	1,7073	-1,095	0,273
LajiPIP NAT	-18,0895	15343,1110	-0,001	0,999

Toisen sekamallin satunnaistekijänä käytettiin näytteen keräysvuotta ($L_i \sim \text{Ikä} + \text{KK} + \text{Eliömaakunta} + \text{Laji} + (1 \mid \text{Vuosi})$). Mallin diagnostiikkakuvien perusteella tämänkin mallin oletukset toteutuvat otoskokoon nähden riittävän hyvin (Kuva 6). Mallin tuottamat estimaatit, keskihajonnat ja z- ja p-arvot löytyvät oheisesta taulukosta (Taulukko 8). Tässäkään mallissa mikään tarkasteltujen muuttujien arvoista ei poikennut merkittävästi toisistaan (kaikkien p-arvot $>0,05$).



Kuva 6 Toisen mallin diagnostiset kuvat. A) Mallin residuaalien (res) jakautuminen eri näytteenkeruuvuosina. Residuaalit ovat suurin piirtein samalla lailla jakautuneita eri vuosina. B) Mallin ennustamien residuaalien (preds) suhde havaittuihin residuaaleihin (res). Näiden välillä ei ole havaittavissa liian suuria eroja.

Taulukko 8 Mallin $L_i \sim \text{Ikä} + \text{KK} + \text{Eliömaakunta} + \text{Laji} + (1 \mid \text{Vuosi})$ estimoidut parametrit, keskihajonnat ja z- ja p-arvot. Satunnaistekijän (vuosi) varianssin estimaatti on $1,388\text{e-}17$ (4 ryhmää).

	Estimaatti	Keskihajonta	z-arvo	p-arvo
(Kulmakerroin)	-3,143e+01	2,899e+06	0,000	1,000
IkäSubad	-1,450e+05	3,079e+07	-0,005	0,996
IkäJuv	1,185e+00	1,184e+00	1,001	0,317
KK6	3,070e+01	2,899e+06	0,000	1,000
KK7	3,098e+01	2,899e+06	0,000	1,000
KK8	3,102e+01	2,899e+06	0,000	1,000
KK9	3,113e+01	2,899e+06	0,000	1,000
EliömaakuntaAb	-9,566e-01	1,336e+00	-0,716	0,474
EliömaakuntaSb	1,610e+05	6,711e+07	0,002	0,998
EliömaakuntaOa	-1,326e+00	1,265e+00	-1,048	0,295
EliömaakuntaKb	-4,987e+04	2,536e+07	-0,002	0,998
EliömaakuntaKa	-1,242e+05	6,711e+07	-0,002	0,999
EliömaakuntaTa	-3,370e+04	2,536e+07	-0,001	0,999
LajiMYODAU	-8,747e-02	1,040e+00	-0,084	0,933
LajiPLEAUR	-1,240e+05	3,443e+07	-0,004	0,997
LajiMYOMYS	3,519e+05	7,384e+07	0,005	0,996
LajiEPTNIL	-1,975e+00	1,494e+00	-1,322	0,186
LajiPIPNAT	-2,325e+05	6,711e+07	-0,004	0,997

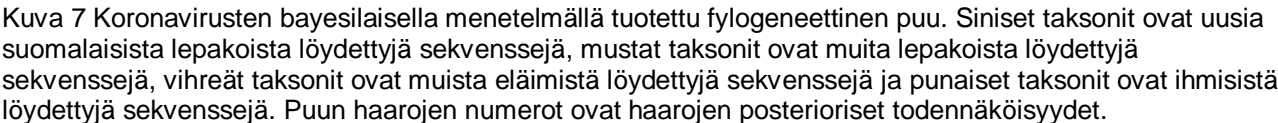
Näitä kahta mallia verrattiin vielä varianssianalyysillä (ANOVA) paremmin aineistoon sopivan satunnaistekijän selvittämiseksi (Taulukko 9). Malli, jossa satunnaistekijänä käytettiin näytteen keräyskuntaa (m1), sopi aineistoon hieman paremmin kuin malli, jossa satunnaistekijänä käytettiin näytteen keräysvuotta (m2), mutta mallien välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa ($p = 1$).

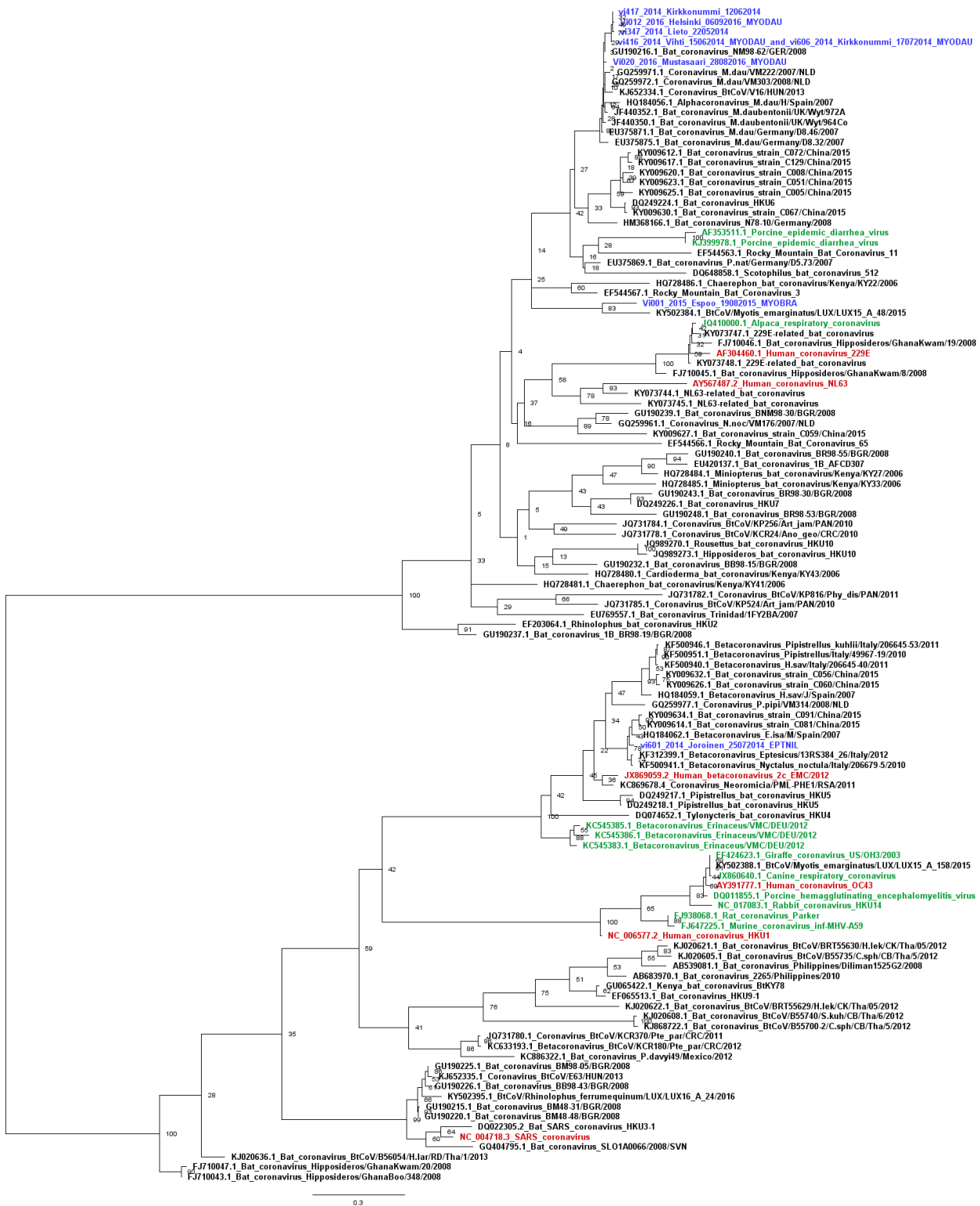
Taulukko 9 Mallien vertailu varianssianalyysillä (ANOVA). Malli, jossa satunnaistekijänä käytettiin näytteen keräyskuntaa, on rivillä m1 ja malli, jossa satunnaistekijänä käytettiin näytteen keräysvuotta, on rivillä m2. Lyhenteet: Df: vapausasteet; AIC: Akaike Information Criterion; BIC: Bayesian Information Criterion; logLik: log-likelihood –testisuure; Chisq: χ^2 testisuure.

	Df	AIC	BIC	logLik	devianssi	Chisq	Chisq Df	p-arvo
m1	19	79.398	123.93	-20.699	41.398			
m2	19	81.124	125.66	-21.562	43.124	0	0	1

3.3 FYLOGENEETTISET ANALYYSIT

Bayesilaisella menetelmällä (Kuva 7) ja ML-menetelmällä (Kuva 8) tuotetut puut olivat topologiaaltaan hyvin samankaltaisia ja tutkimuksessa löydetty sekvenssit ryhmittyvät molemmissa puissa samoihin kladeihin.





Kuva 8 Koronavirusten suurimman todennäköisyyden Maximum Likelihood -puu. Siniset taksonit ovat uusia suomalaisista lepakoista löydettyjä sekvenssejä, mustat taksonit ovat muita lepakoista löydettyjä sekvenssejä, vihreät taksonit ovat muista eläimistä löydettyjä sekvenssejä ja punaiset taksonit ovat ihmisistä löydettyjä sekvenssejä. Puun haarojen numerot ovat haarojen luotettavuudesta kertovia bootstrap-arvoja.

4 TULOSTEN TARKASTELU

Tutkimuksessa todettiin yhteensä 18 lepakkoyksilöä, jotka kantoivat koronaviruksia. Fylogeneettisten analyysien perusteella yksi näistä kantoi beetakoronavirusta ja loput alfakoronaviruksia. Lisäksi neljästä päivehtimispaikkanäytteestä löydettiin alfakoronaviruksia. Paramyksenoviruksia ei löytynyt tutkituista näytteistä.

4.1 KORONAVIRUKSET SUOMALAISISSA LEPAKKOLAJEISSA

Helsingin yliopistolla tehdyssä seulonnassa käytetty RT-qPCR-menetelmä ja positiivisten seulontatulosten varmistamisessa käytetty RT-PCR-menetelmä toimivat oikein hyvin. RT-qPCR-menetelmä ei jostain syystä tunnistanut OC43-koronavirusta. Tämä tuskin on suuri ongelma, sillä kyseinen virus kuuluu Beetakoronavirus 1 –ryhmään, johon on tähän mennessä todettu kuuluvan vain yksi lepakoiden koronavirus (Pauly ym. 2017). Näitä menetelmiä voi siis jatkossakin hyödyntää tutkimuksissa, mutta seulontamenetelmää voisi optimoida tunnistamaan kaikki tunnetut koronavirusryhmät. Tutkielmassa ei myöskään varmistettu RT-qPCR-menetelmän diagnostista herkkyyttä (Bustin ym. 2009). Sen testaaminen olisi työläs, mutta merkittävä osa virusten esiintyvyyssarvioiden tekemistä. Diagnostisen herkkyyden voisi testata käymällä kaikki tutkielman näytteet läpi yhdellä tai muutamalla RT-PCR-menetelmällä, joita voidaan pitää koronavirusten etsinnässä ns. ”gold standard” –menetelminä eli joihin muiden menetelmien herkkyyttä verrataan.

Yhteensä neljän vuoden aikana kerättiin 77 ulostenäytettä, 38 anaalipyyhkäisynäytettä ja 28 päivehtimispaikkanäytettä, joista oli tallennettu riittävät tiedot (lepakkolaji tai päivehtimispaikkojen osalta oletettu laji, lepakon sukupuoli, lepakon ikä, pyydystys- tai keräyspäivämäärä, pyydystys- tai keräyspaikka ja renkaan numero). Ne näytteet, joista näitä tietoja ei ollut tai tiedoissa oli muuta epäselvyyttä, jätettiin tarkastelun ulkopuolelle. Erityisesti vuosien 2013 ja 2014 näytteiden osalta tiedoissa oli paljon aukkoja, minkä lisäksi kahtena jälkimmäisenä vuonna oli muutamia epäselvyyksiä näyteputkiin kirjattujen lepakkorengasnumeroiden ja rengastuskirjanpidon välillä. Näytteiden keruutavasta johtuvan aineistojen hajanaisuuden takia viruksen esiintyvyydestä ei voida esittää luotettavaa arviota. Aineiston perusteella voisin kuitenkin sanoa, että esiintyvyys tuskin on meta-analyysin tuloksena saatua maailmanlaajuista 6 % esiintyvyyssarviota pienempi (Young ja Olival 2016).

Tutkielmassa esitellään ensimmäiset koronaviruslöydökset pohjanlepakoista. Löydöistä toinen on Uudeltamaalta ja toinen Pohjois-Savosta pyydystetyistä nuorista yksilöistä. Nämä näytteet käsiteltiin Eivirassa vuonna 2014. Pohjois-Savosta kerätyn näytteen virus kuuluu beetakoronaviruksiin ja on läheistä sukua muilta *Eptesicus*-suvun lajeilta löydettyille koronaviruksille, jotka puolestaan ovat melko läheistä

sukua MERS-koronavirukselle. Espoon näytteestä saatu sekvenssi oli liian lyhyt fylogeneettisiin analyyseihin. Beetakoronaviruksia on muissa tutkimuksissa löydetty eteläeurooppalaisista, kiinalaisista ja korealaisista etelänlepakoista (*E. serotinus*) ja espanjalaisesta etelänlepakolle läheistä sukua olevasta *E. isabellinus* –lajista, minkä lisäksi alfakoronaviruksia on löydetty Kiinassa etelänlepakosta ja Yhdysvalloissa amerikanserotiinista (*E. fuscus*) (Dominguez ym. 2007, Falcón ym. 2011, De Benedictis ym. 2014, Han ym. 2017, Lee ym. 2018).

Tutkielmassa esitellään myös ensimmäiset koronaviruslöydöt isoviiksisiipasta. Molemmat löydökset ovat Uudeltamaalta, toinen vuodelta 2015 ja toinen vuodelta 2016. Vuoden 2015 virus kuuluu alfakoronaviruksiin ja samaan koronavirusten haaraan kuin luxemburgilaisesta ruskosiipasta (*Myotis emarginatus*) löydetty koronavirus. Vuoden 2016 virus jätettiin pois fylogeneettisista analyyseista sekvenssin lyhyden takia, mutta näytteestä eristettyä hyväkuntoista RNA:ta on vielä jäljellä ja siitä on mahdollista saada pidempi sekvenssi tulevaisuudessa. Ennen luxemburgilaisen sekvenssin julkaisua tehdyissä analyyseissä isoviiksisiippasekvenssi ryhmittyi samaan klaadiin pohjoisamerikkalaisesta ”arizonansiipasta” (*Myotis occultus*) löydetyn sekvenssin kanssa. Isoviiksisiippa on fylogeneettisesti lähempänä amerikkalaisia siippoja kuin eurooppalaisia siippoja (Ruedi ym. 2013), joten kaikista kolmesta edellä mainitusta siippalajista sekä niiden lähimmistä sukulaislajeista pitäisi saada kerättyä lisää näytteitä, jotta voitaisiin arvioida tämän alfakoronaviruksen alkuperää ja leviämisreittiä.

Eniten koronaviruksia löydettiin vesisiipoista (8 positiivista ulostenäytettä, 4 positiivista anaalipyyhkäisynäytettä) ja nämä virukset ryhmittyivät alfakoronavirusten sisällä eurooppalaisista vesisiipoista saatujen sekvenssien joukkoon. Vaikuttaisi siltä, että vesisiipat kantavat Euroopassa omaa alfakoronavirustaan, jonka RdRP-geenissä on vain vähän muuntelua. Tämä viittaisi siihen, että Euroopan vesisiippapopulaatiot ovat joko keskenään edelleen yhteydessä toisiinsa tai ne ovat vastikään levittäytyneet koko Euroopan alueelle. Suurin osa Suomesta kerätyistä vesisiippänäytteistä saaduista sekvensseistä ryhmittyy keskenään omaksi klaadikseen, poikkeuksena Merenkurkussa sijaitsevasta Mustasaaren kunnasta pyydystetystä vesisiipasta löydetyn alfakoronaviruksen sekvenssi, joka on lähempänä Keski-Euroopasta löydettyjä sekvenssejä. Aiemmin on todettu, että suomalaiset vesisiipat eivät ole geneettisesti eristäytyneitä muista eurooppalaisista populaatioista (Laine ym. 2013). Mustasaaren vesisiipan kantaman koronaviruksen eroavaisuus viittaisi kuitenkin mahdollisuuteen, että Merenkurkun vesisiippapopulaatio olisi mahdollisesti saapunut Ruotsin rannikkoa pitkin, kun taas Suomenlahden pohjoisrannan populaatio olisi saapunut itäistä reittiä. Vastaavaa fylogeografiaa on nimittäin todettu esiintyvän monilla jääkauden jälkeen Suomeen levittäytyneillä pikkunisäkkäillä, kuten metsä- ja peltomyyrillä (Jaarola ym. 1999, Asikainen ym. 2000). Asian selvittämiseksi tarvittaisiin lisää vesisiipan koronavirusnäytteitä Merenkurkun ja Suomenlahden rannikon lisäksi lännestä Ruotsin rannikolta ja idästä esimerkiksi Venäjältä Karjalankannakselta tai Viron pohjoisrannikolta.

Tutkimusaineisto ja siitä muodostetut logistiset regressiosekamallit eivät tuoneet vastauksia esittämiini tutkimuskysymyksiin koronavirusten osalta. Nuoret lepakot vaikuttivat kantavan koronaviruksia hieman useammin kuin muut ikäryhmät, mutta ero ei ole tilastollisesti merkitsevä. Nuorilta ja esiaikuisilta yksilöiltä kerättyjä ulostenäytteitä oli aineistossa huomattavasti vähemmän kuin aikuisilta yksilöiltä kerättyjä näytteitä (Kuva 2, F), joten otos ei ollut tässä suhteessa riittävän tasapainoinen. Sekä Saksassa että Australiassa tehdyissä *Myotis*-suvun siipojen lisääntymisyhdyskuntien pitkäaikaisseurannoissa on huomattu, että koronavirusten esiintyvyys ja virusmäärät ulosteissa kasvavat yhdyskunnan muodostuessa, minkä jälkeen ne laskevat kunnes nousevat uudestaan poikasten emoiltaan saamien vasta-aineiden hiipuesssa, jolloin yhdyskuntaan muodostuu uusi tautitartunnalle altis ryhmä (Drexler ym. 2011, Jeong ym. 2017). Päivehtimispaikkanäytteissä on huomattavissa samankaltainen ilmiö kesä-, heinä- ja elokuuden aikana kerätyissä näytteissä, joista vain kesä- ja elokuuden näytteissä havaittiin koronavirusta (Kuva 4, D). Suomessa lisääntymisyhdyskunnat muodostuvat huhti-toukokuussa, poikaset syntyvät kesä-heinäkuussa ja elokuuhun mennessä poikaset ovat itsenäistyneet (Lappalainen 2003), joten aineistossa havaittava vaihtelu vastaisi edellä mainittujen tutkimusten tuloksia. Päivehtimispaikka-aineistossa on kuitenkin joitakin ongelmia: Touko- ja syyskuuden aikana kerättiin kumpanakin vain yhdet riittävillä tiedoilla varustetut päivehtimispaikkanäytteet, minkä lisäksi vuoden 2014 elokuussa kerättiin neljätoista näytettä samana päivänä ja samalta paikalta. Koronaviruksen epidemiologian tutkiminen lepakoiden lisääntymisyhdyskunnissa olisi oman Pohjoismaissa toteutettavan ja järjestelmällisen toistotutkimuksen arvoinen, sillä näytteiden keruu on helppoa ja sopivalla paikalla lepakkoita ei tarvitse käsitellä näytteiden keruun yhteydessä, jolloin näytteitä voi kerätä lepakkoita liikaa häiritsemättä ja ilman lepakoiden rengastuslupaa. Pitkäaikaisaineiston kerryttämiseksi samoja paikkoja pitäisi kuitenkin seurata monen kuukauden ja usean vuoden ajan.

Edellä mainitusta ikäryhmien välisestä pienestä erosta huolimatta ulostenäytteissä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa kuukausien välillä. Tämäkään aineisto ei ollut kuukausien suhteen tasapainoinen, sillä elokuuden aikana kerättyjä ulostenäytteitä oli huomattavasti muita kuukausia enemmän (Kuva 2, D). Toisaalta anaalipyyhkäisynäytteissä kaikki positiiviset näytteet kerättiin elokuussa (Kuva 3, D). Lähes kaikki näistä anaalipyyhkäisynäytteistä oli kuitenkin kerätty Uudeltamaalta ja neljä viidestä positiivisesta näytteestä oli samasta paikasta ja samalta yöltä, joten niistä ei voi tehdä yleistyksiä. Yksi elokuussa kerättyjen näytteiden määrän kasvuun vaikuttava tekijä on öiden piteneminen elokuuhun mennessä eteläisen Suomen leveysasteilla, jolloin yhden yön aikana on yksinkertaisesti enemmän aikaa pyydystää lepakkoita. Lisäksi lepakot ovat elokuussa hyvin aktiivisia, koska kesän aikana syntyneet poikaset opettelevat saalistusta ja elinympäristöään aikuisten opastuksella ja lepakoiden täytyy kerätä energiaa lähestyvää talvehtimista varten (Lappalainen 2003). Toisaalta puolet sekä kesä- että heinäkuusta on lepakoiden rauhoitusaikaa, jolloin esimerkiksi yksilöityjen ulostenäytteiden kerääminen ei ole mahdollista.

Eliömaantieteellisistä alueista Etelä-Pohjanmaa erottui malleissa hieman matalammalla viruksen esiintymisellä, mutta ero muihin alueisiin ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Tässä aineistossa Etelä-Pohjanmaan näytteitä oli vain Mustasaaren kunnasta. Maantieteellisiä eroja koronaviruksen esiintymisessä ei siis voida todeta tämän aineiston perusteella. Näytteitä tulisi kerätä laajalta alueelta mahdollisimman samanaikaisesti ja kultakin paikalta riittävästi, jotta tilastollisissa mallinnuksissa ei tarvitsisi huomioida ajankohdan vaikutusta ja jotta otoskoko olisi riittävä ilmiötä hyvin kuvaavan mallin muodostamiseen.

4.2 EI PARAMYKSOVIRUKSIA SUOMALAISISSA LEPAKOISSA

Tutkimuksessa muokattiin aiemmin julkaistuja RT-PCR-menetelmän alukkeita uusien virussekvenssien perusteella ja näitä alukkeita käytettiin paramyksen virusten seulonnassa osana RT-qPCR-menetelmää. Seulontamenetelmä tunnisti kaksi varsinaiseksi positiivikontrolleiksi tarkoitettua virusta eikä se ristireagoinut HUSLABissa negatiivisiksi todettujen potilasnäytteiden kanssa, mutta se ei tunnistanut potilasnäytteiden mukana toimitettua positiivikontrollia. Menetelmä siis periaatteessa toimii, mutta sitä olisi hyvä testata useammilla paramyksen viruksilla menetelmän diagnostisen herkkyyden toteamiseksi ja tarvittaessa tehdä muokkauksia alukkeisiin ja jatkaa menetelmän optimointia.

Paramyksen viruksia ei tutkimuksen puitteissa löydetty suomalaisista lepakoista, mutta näytteitä oli vähän ja vain vuosilta 2015 ja 2016. Saksasta, Bulgariasta ja Romaniasta on kerätty ja tutkittu toista tuhatta lepakoiden uloste- ja verinäytteitä, joista vain murto-osa, noin 0,8 % (12/1570), oli positiivisia paramyksen viruksille (Drexler ym. 2012). Tuossa tutkimuksessa paramyksen viruksia kuitenkin löydettiin Suomessakin esiintyviltä lajeilta (vesisiippa ja viiksisiippa), joten näiden virusten löytyminen suomalaisilta lepakoilta on mahdollista, mutta vaatii huomattavasti suurempaa panostusta aineiston keruuseen ja tutkimiseen laboratorioissa. Tähän mennessä lähes kaikkien sekä lepakoita että ihmisiä tartuttavien paramyksen virusten on todettu esiintyvän lepakoista vain hedelmälepakoilla, joten suomalaisten lepakoiden kantamat paramyksen virukset tuskin ovat kansanterveydellinen uhka (Thibault ym. 2017). Tämän lisäksi suomalaisille tarjottavan MPR-rokotteen aiheuttama immunisaatio tuhkarokkoa ja sikotautia vastaan saattaa antaa suojan myös muita morbilli- ja rubulaviruksia ja niiden kaltaisia viruksia vastaan (Thibault ym. 2017). Suomesta tai muualta pohjoisilta leveyspiireiltä löydetty lepakoiden paramyksen virukset voisivat kuitenkin antaa vertailukohdan muualta löydetuille tämän suvun viruksille ja näin tuoda merkittävästi uutta tietoa niiden evoluutiohistoriasta ja leviämisdynamiikasta.

4.3 VIRHELÄHTEET

Aiemmin mainitun näytteiden keruutavan satunnaisuudesta ja siitä johtuvan aineiston hajanaisuuden lisäksi aineistossa oli myös muita tuloksiin vaikuttavia tekijöitä. Tutkimus aloitettiin Eivasssa, minkä

seurauksena en voinut täysin varmistua näytteiden käsittely- ja säilytystavoista. Tämän lisäksi vuosien 2013 ja 2014 näytteiden tietojen ja tulosten toimitus ei tapahtunut kaikkein optimaalisimmalla tavalla. Noiden vuosien näytteiden tietoja on tarkastettu moneen kertaan ja puutteellisiksi jääneiden tietojen takia osa näytteistä jätettiin pois lopullisista analyyseista, mutta aineistossa olevien virheiden mahdollisuus on edelleen olemassa. Yksi vuoden 2016 näyte täytyi jättää pois aineistosta, sillä näyteputkessa ollut lepakon rengasnumero ei vastannut näytteen toimittaneen rengastajan omia muistiinpanoja, mikä on todennäköisesti ollut seurausta laboratorioissa tekemästani näyteputken merkintöjen väärästä tulkinnasta. Samalla, kun osa aineistosta jätettiin huomiotta, siihen saatettiin aiheuttaa vääristymää. Yksikään analyyseista pudotetuista näytteistä ei sisältänyt koronavirusta, joten positiivisiksi todettujen näytteiden tiedot on todennäköisesti tallennettu paljon huolellisemmin kuin negatiivisiksi todettujen näytteiden. Myös tästä syystä virusten esiintyvyydestä ei tutkielman perusteella saada luotettavaa arviota.

Vuoden 2015 ulostenäytteistä pienempi osuus on sisältänyt koronaviruksia muihin tutkimusvuosiin verrattuna. Tuon vuoden näytteitä säilytettiin maastokauden jälkeen ensin useita kuukausia huoneenlämmössä, minkä jälkeen ne siirrettiin +4 °C lämpötilaan noin viiden kuukauden ajaksi. Tämä on varmasti laskenut näytteiden viruspitoisuuksia ja ainoa tuona vuonna havaittu virus erottui seulonnassa hyvin heikosti. RNALater suojaa RNA:ta jonkin verran lyhytaikaisessa säilytyksessä myös huoneenlämmössä, mutta näytteet tulisi optimaalisessa tilanteessa säilyttää viileässä ja käsitellä laboratorioissa mahdollisimman pian.

Tutkielmassa viruksia etsittiin vain ulostemateriaalista. Ainakin paramyksamyokymyovirusten löytyminen on paljon todennäköisempää kudoksenäytteistä, mutta koronavirusten seulonnassa ulostenäytteet vastaavat melko hyvin kudoksenäytteitä (Young ja Olival 2016). Koronavirukset lisääntyvät lepakoiden suolistossa, minkä seurauksena niitä erittyy paljon ulosteeseen (Widagdo ym. 2017), joten koronavirusten osalta aineistossa tuskin on tutkimusmateriaalista johtuvia vääriä negatiivisia tuloksia. Monet paramyksamyokymyovirukset sen sijaan käyttävät soluihin tunkeutumiseen erityisesti keuhkoissa esiintyviä reseptoreita (Thibault ym. 2017), joten keuhkokudoksen käyttö näytemateriaalina todennäköisesti kasvattaisi paramyksamyokymyovirusten löytymisen todennäköisyyttä. Suomalaisten lepakoiden tiukan suojelun ja paramyksamyokymyovirusten oletettavasti matalan esiintyvyyden takia kudoksenäytteiden keruu vaatii kuitenkin vahvat perustelut ja hyvin tarkan tutkimussuunnitelman.

4.4 TULEVAT TUTKIMUKSET

Tutkielmassa esitellyt tulokset toimivat hyvänä lähtökohtana jatkotutkimuksille. Nyt kun lepakoiden koronaviruksia on todettu esiintyvän eri puolilla eteläistä Suomea, voidaan jatkotutkimuksia kohdistaa joko virusten esiintymisalueille tai niille alueille, joista virusta ei löydetty tai josta ei ollut lainkaan näytteitä.

Virusten esiintymisalueilta tulisi kerätä enemmän näytteitä ja suunnitella näytteiden keruu niin, että näyteaineisto on lepakoiden lajien, sukupuolten, ikäryhmien ja näytteiden keruuajankohtien suhteen tasapainossa, jolloin voitaisiin esittää luotettavia arvioita koronavirusten esiintyvyydestä sekä esiintyvyyden vaihtelusta kuukausien ja vuosien välillä. Virusten eristäminen ja kasvattaminen soluviljelmillä mahdollistaisi niiden tarkemman tutkimuksen ja virusten koko genomien selvittämisen avulla voitaisiin tehdä päätelmiä niiden evoluutio- ja leviämishistoriasta sekä niiden merkityksestä lepakoiden ja ihmisten taudinaiheuttajina. Koronavirusten seulontaa kannattaa jatkaa myös uusilla tai vain muutamien näytteiden perusteella viruksista vapaiksi todetuilla alueilla, jotta olisi mahdollista muodostaa kokonaiskuva näiden virusten todellisesta maantieteellisestä levinneisyydestä. Tämän lisäksi on myös mahdollista löytää sellaisia viruskantoja, jotka eivät ole läheistä sukua nyt löydetuille viruksille. Tutkielmani perusteella voidaan esittää useita uusia tutkimuskysymyksiä: kuinka läheistä sukua pohjanlepakon beetakoronavirus todella on muille saman lepakkosuvun kantamille viruksille, eroavatko Merenkurkussa ja Suomenlahden rannikolla elävien vesisiippojen alfakoronavirukset toisistaan ja mihin klaadiin isoviiksisiipan alfakoronavirus sijoittuu viruksen muiden geenien mukaan rakennetuissa fylogeniapuissa?

Paramykosvirusten etsinnässä tulisi erityisesti keskittyä näytemäärien kasvattamiseen ja seulontamenetelmän optimointiin. Menetelmää tulisi testata tuhkarokko- ja penikkatautiviruksen lisäksi myös muilla viruksilla, erityisesti muualta vastaavanlaisista lepakkonäytteistä löydettyillä paramykosviruksilla. Tämä edellyttää kansainvälistä yhteistyötä muiden maiden lepakkovirustutkijoiden kanssa. Vaihtoehtoisten näytemateriaalien, kuten oraaliptyyhkäisy- tai kudoksenäytteiden, kerääminen voi myös lisätä virusten löytymisen todennäköisyyttä.

Tutkielmassa keskityttiin vain kahteen virusheimoon, mutta lepakoista on todettu lukuisia muitakin zoonoottisia viruksia (Calisher ym. 2006, Young ja Olival 2016). Myös näiden seulontaa tulisi harkita, sillä näistä monet on todettu joko varsin yleisiksi, kuten astrovirukset (Young ja Olival 2016), tai ne ovat erityisen merkittäviä taudinaiheuttajia, kuten filovirukset (Han ym. 2016). Näistä jälkimmäisiä on esimerkiksi jo löydetty pitkäsiipilepakoista (*Miniopterus schreibersii*) kahdessa Euroopan maassa (Negredo ym. 2011, Kemenesi ym. 2018). Suurimmalle osalle todetuista tai potentiaalisista zoonoottisista viruksista on jo kehitetty monia molekyylibiologisia seulontamenetelmiä, joiden käyttöön ottaminen ja uusien virusten seulonnan aloittaminen myös Suomessa olisi toteutettavissa varsin pienellä panostuksella esimerkiksi tätä tutkielmaa varten vuosina 2015 ja 2016 kerätyistä näytteistä, joista kaikista on vielä RNA:ta jäljellä.

4.5 YHTEENVETO

Lepakot ovat lajimäärältään, monimuotoisuudeltaan ja ekologisilta ominaisuuksiltaan merkittävä nisäkäslahko, jonka Suomessa esiintyvät edustajat elävät täällä levinneisyytensä pohjoisrajalla. Koronavirukset ja paramyksovirukset ovat merkittäviä lepakoiden kantamia zoonooseja. Tässä tutkielmassa on käyty läpi eteläisestä Suomesta kerättyjä lepakoiden uloste- ja anaalipyyhkäisyäyhteitä sekä ulostenäytteitä päivehtimispaikoilta vuosilta 2014–2016. Seulonnan tuloksena löydettiin useita alfakoronaviruksia ja yksi beetakoronavirus, joista isoviiksisiipan alfakoronavirus ja pohjanlepakon beetakoronavirus olivat tieteelle uusia löydöksiä ja vesisiipan alfakoronaviruksissa havaittiin merkkejä alueellisista eroista Suomen sisällä. Paramyksoviruksia ei löydetty tutkituista näytteistä. Tämä tutkielma laajentaa lepakoiden koronavirusten tunnettua isäntälajikirjoa ja esiintymisaluetta, minkä lisäksi se toimii hyvänä lähtökohtana uusien näytteiden keräämiselle ja jatkotutkimuksille, joissa voidaan muun muassa selvittää koronavirusten tarkkaa esiintyvyyttä eri alueilla ja eri aikoina ja pyrkiä virusten eristämiseen soluviljelmillä ja virusten koko genomin selvittämiseen.

5 KIITOKSET

Erityisesti haluan kiittää graduohjaajaani Tarja Sirosta osaavasta ohjauksesta, tärkeistä neuvoista, arvokkaista kommentteista ja kärsivällisestä tuesta tutkielmani pitkän kypsyamisen aikana. Tämä tutkielma ei olisi ollut mahdollinen ilman Eeva-Maria Kyheröisen, Thomas Lilley'n ja Kati Suomisen keräämiä näytteitä. Heidän lisäksi haluan kiittää kaikkia tutkielman aineiston keräämiseen osallistuneita kenttätöiden avustajia, erityisesti Emma Hakasta ja Petra Rinnettä, ja kenttätöiden mahdollistajia, erityisesti John Loehria. Tutkielmaa oli hyvä lähteä rakentamaan Evirassa aloitetun tutkimuksen pohjalta ja haluankin kiittää Anita Huovilaista ja Merja Hautalaa saamastani aineistosta. Kiitokset Anne Jääskeläiselle, jonka luovuttamat potilasnäytteet ja asiantuntevat neuvot RT-qPCR-menetelmien ihmeellisessä maailmassa olivat suureksi avuksi. Hannu Pietiäiselle suuret kiitokset tutkielman kommentoimisesta kirjoitusprosessin aikana. Kiitos zoonosivirologian tutkimusryhmän johtajalle Olli Vapalahdelle työskentelymahdollisuudesta kiinnostavan aiheen parissa. Kiitokset tutkielmaani gradustipendeillä rahoittaneille toimijoille: Suomen Biologian Seura Vanamo ry ja Oskari ja Siiri Vilamon rahasto, Hämmäläisten ylioppilassäätiö ja Hämmäläis-Osakunta. Kiitokset myös muille tutkielmaa rahoituksellaan edistäneille toimijoille: Jenny ja Antti Wihurin rahasto ja Suomen eläinlääketieteen säätiö. Lopuksi haluan kiittää vanhempiani kaikesta siitä tuesta ja kannustuksesta, joita olen heiltä saanut opintojeni aikana.

6 LÄHDELUETTELO

- Anthony S. ym. 2017. Further Evidence for Bats as the Evolutionary Source of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. — *mBio* 8: 1–13.
- Asikainen K., Hänninen T., Henttonen H., Niemimaa J., Laakkonen J., Andersen H.K., Bille N., Leirs H., Vaheri A. ja Plyusnin A. 2000. Molecular evolution of Puumala hantavirus in Fennoscandia: Phylogenetic analysis of strains from two recolonization routes, Karelia and Denmark. — *Journal of General Virology* 81: 2833–2841.
- Bates D., Mächler M., Bolker B. ja Walker S. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. — *Journal of Statistical Software* 67: 1–48.
- Becker R.A., Wilks A.R., Brownrigg R., Minka T.P. ja Deckmyn A. 2016. maps: Draw Geographical Maps.
- De Benedictis P., Marciano S., Scaravelli D., Priori P., Zecchin B., Capua I., Monne I. ja Cattoli G. 2014. Alpha and lineage C betaCoV infections in Italian bats. — *Virus genes* 48: 366–71.
- Bivand R. ja Lewin-Koh N. 2016. maptools: Tools for reading and handling spatial objects.
- Bivand R.S., Pebesma E.J. ja Gómez-Rubio V. 2013: *Applied Spatial Data Analysis with R*. 2. painos, Springer, NY, 378 s.
- Boyles J.G., Cryan P.M., McCracken G.F. ja Kunz T.H. 2011. Economic Importance of Bats in Agriculture. — *Science* 332: 41–42.
- Brierley L., Vonhof M.J., Olival K.J., Daszak P. ja Jones K.E. 2016. Quantifying Global Drivers of Zoonotic Bat Viruses: A Process-Based Perspective. — *The American Naturalist* 187: E53–E64.
- Brook C.E. ja Dobson A.P. 2015. Bats as ‘special’ reservoirs for emerging zoonotic pathogens. — *Trends in Microbiology* 23: 172–180.
- Brunsdon C. ja Hongyan C. 2014. GISTools: Some further GIS capabilities for R.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J. ja Wittwer C.T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. — *Clinical Chemistry* 55: 611–622.
- Calisher C.H., Childs J.E., Field H.E., Holmes K. V ja Schountz T. 2006. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. — *Clinical microbiology reviews* 19: 531–45.
- CDC 1999. Outbreak of Hendra-Like Virus — Malaysia and Singapore , 1998 – 1999. — *Morbidity and Mortality Weekly* 48: 1998–1999.
- Clayton B., Wang L. ja Marsh G. 2013. Henipaviruses: an updated review focusing on the pteropid reservoir and features of transmission. — *Zoonoses and public health* 60: 69–83.
- Corman V.M. ym. 2015. Evidence for an Ancestral Association of Human Coronavirus 229E with Bats. — *Journal of Virology* 89: 11858–11870.
- Corman V.M., Ithete N.L., Richards L.R., Schoeman M.C., Preiser W., Drosten C. ja Drexler J.F. 2014. Rooting the Phylogenetic Tree of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus by Characterization of a Conspecific Virus from an African Bat. — *Journal of Virology* 88: 11297–11303.
- Dominguez S.R., O’Shea T.J., Oko L.M. ja Holmes K. V 2007. Detection of group 1 coronaviruses in bats in North America. — *Emerging Infectious Diseases* 13: 1295–1300.

- Drexler J.F., Corman V.M., Wegner T., Tateno A.F., Zerbinati R.M., Gloza-Rausch F., Seebens A., Müller M. ja Drosten C. 2011. Amplification of emerging viruses in a bat colony. — *Emerging infectious diseases* 17: 449–456.
- Drexler J.F. ym. 2012. Bats host major mammalian paramyxoviruses. — *Nature Communications* 3: 796.
- Drexler J.F., Corman V.M. ja Drosten C. 2014. Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. — *Antiviral research* 101: 45–56.
- Drosten C. ym. 2003. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. — *New England Journal of Medicine* 348: 1967–1976.
- Edgar R.C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. — *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.
- Falcón A., Vázquez-Morón S., Casas I., Aznar C., Ruiz G., Pozo F., Perez-Breña P., Juste J., Ibáñez C., Garin I., Aihartza J. ja Echevarría J.E. 2011. Detection of alpha and betacoronaviruses in multiple Iberian bat species. — *Archives of Virology* 156: 1883–1890.
- Fehr A.R. ja Perlman S. 2015: Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. Teoksessa H. J. Maier, E. Bickerton, & P. Britton, toim. *Coronaviruses*. Methods in Molecular Biology. Springer New York, New York, NY, s. 1–23.
- Gloza-Rausch F., Ipsen A., Seebens A., Götsche M., Panning M., Drexler J.F., Petersen N., Annan A., Grywna K., Müller M., Pfefferle S. ja Drosten C. 2008. Detection and Prevalence Patterns of Group I Coronaviruses in Bats, Northern Germany. — *Emerging Infectious Diseases* 14: 626–631.
- Graham R.L. ja Baric R.S. 2010. Recombination, Reservoirs, and the Modular Spike: Mechanisms of Coronavirus Cross-Species Transmission. — *Journal of Virology* 84: 3134–3146.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. — *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Halpin K., Young P.L., Field H.E. ja Mackenzie J. 2000. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. — *The Journal of general virology* 81: 1927–32.
- Han B.A., Schmidt J.P., Alexander L.W., Bowden S.E., Hayman D.T. ja Drake J.M. 2016. Undiscovered Bat Hosts of Filoviruses. — *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10: 1–10.
- Han H.J., Wen H.L., Zhao L., Liu J.W., Luo L.M., Zhou C.M., Qin X.R., Zhu Y.L., Liu M.M., Qi R., Li W.Q., Yu H. ja Yu X.J. 2017. Novel coronaviruses, astroviruses, adenoviruses and circoviruses in insectivorous bats from northern China. — *Zoonoses and Public Health* 64: 636–646.
- Hilgenfeld R. ja Peiris M. 2013. From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. — *Antiviral research* 100: 286–95.
- Ithete N.L., Stoffberg S., Corman V.M., Cottontail V.M., Richards L.R., Schoeman M.C., Drosten C., Drexler J.F. ja Preiser W. 2013. Close relative of human middle east respiratory syndrome coronavirus in bat, South Africa. — *Emerging Infectious Diseases* 19: 1697–1699.
- IUCN 2017. The IUCN Red List of Threatened Species, version 2017-2. Osoitteessa: <http://www.iucnredlist.org/>. Viitattu 30. marraskuuta 2017.
- Jaarola M., Tegelström H. ja Fredga K. 1999. Colonization history in Fennoscandian rodents. — *Biol. J. Linnean Soc.* 68: 113–127.
- Jakava-Viljanen M., Lilley T.M., Kyheröinen E.-M. ja Huovilainen A. 2010. First encounter of European bat lyssavirus type 2 (EBLV-2) in a bat in Finland. — *Epidemiology and Infection* 138: 1581–1585.

- Jeong J., Smith C.S., Peel A.J., Plowright R.K., Kerlin D.H., McBroom J. ja McCallum H. 2017. Persistent infections support maintenance of a coronavirus in a population of Australian bats (*Myotis macropus*). — *Epidemiology and Infection* 145: 2053–2061.
- Jonsdottir H.R. ja Dijkman R. 2016. Coronaviruses and the human airway: a universal system for virus-host interaction studies. — *Virology Journal* 13: 24.
- Karesh W.B., Dobson A., Lloyd-Smith J.O., Lubroth J., Dixon M.A., Bennett M., Aldrich S., Harrington T., Formenty P., Loh E.H., MacHalaba C.C., Thomas M.J. ja Heymann D.L. 2012. Ecology of zoonoses: Natural and unnatural histories. — *The Lancet* 380: 1936–1945.
- Kemenesi G., Kurucz K., Dallos B., Zana B., Földes F., Boldogh S., Görföl T., Carroll M.W. ja Jakab F. 2018. Re-emergence of Lloviu virus in *Miniopterus schreibersii* bats, Hungary, 2016. — *Emerging Microbes and Infections* 7: 67–70.
- Kreuder Johnson C., Hitchens P.L., Smiley Evans T., Goldstein T., Thomas K., Clements A., Joly D.O., Wolfe N.D., Daszak P., Karesh W.B. ja Mazet J.K. 2015. Spillover and pandemic properties of zoonotic viruses with high host plasticity. — *Scientific Reports* 5: 14830.
- Kuhn J., Li W., Choe H. ja Farzan M. 2004. Angiotensin-converting enzyme 2: A functional receptor for SARS coronavirus. — *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 2738–2743.
- Kumar S., Stecher G. ja Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. — *Molecular biology and evolution* 33: 1870–1874.
- Kunz T.H., Braun de Torrez E., Bauer D., Lobo T. ja Fleming T.H. 2011. Ecosystem services provided by bats. — *Annals of the New York Academy of Sciences* 1223: 1–38.
- Kunz T.H. ja Weise C.D. 2009: *Methods and Devices for Marking Bats*. Teoksessa T. H. Kunz & S. Parsons, toim. *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. The John Hopkins University Press, Baltimore, Md, s. 36–56.
- Kurth A., Kohl C., Brinkmann A., Ebinger A., Harper J. a., Wang L.F., Mühlendorfer K. ja Wibbelt G. 2012. Novel paramyxoviruses in free-ranging European bats. — *PLoS ONE* 7: e38688.
- Kyheröinen E.-M., Osara M. ja Stjernberg T. 2014. *Agreement on the conservation of populations of European bats National implementation report of Finland*. 8 s.
- Laine V.N., Lilley T.M., Norrdahl K. ja Primmer C.R. 2013. Population Genetics of Daubenton's Bat (*Myotis daubentonii*) in the Archipelago Sea, SW Finland. — *Annales Zoologici Fennici* 50: 303–315.
- Lappalainen M. 2003: *Lepakot, salaperäiset nahkasiivet*. 2. painos, Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä, 207 s.
- Lau S., Woo P., Li K., Huang Y., Tsoi H.-W., Wong B., Wong S., Leung S.-Y., Chan K.-H. ja Yuen K.-Y. 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. — *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 14040–14045.
- Lee S., Jo S.-D., Son K., An I., Jeong J., Wang S.-J., Kim Y., Jheong W. ja Oem J.-K. 2018. Genetic Characteristics of Coronaviruses from Korean Bats in 2016. — *Microbial Ecology* 75: 174–182.
- Lei M. ja Dong D. 2016. Phylogenomic analyses of bat subordinal relationships based on transcriptome data. — *Scientific Reports* 6: 27726.
- Lelli D., Papetti A., Sabelli C., Rosti E., Moreno A. ja Boniotti M.B. 2013. Detection of coronaviruses in bats of various species in Italy. — *Viruses* 5: 2679–89.

- Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., Wang H., Crameri G., Hu Z., Zhang H., Zhang J., McEachern J., Field H., Daszak P., Eaton B.T., Zhang S. ja Wang L.-F. 2005. Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. — *Science* 310: 676–679.
- Lilley T.M., Veikkolainen V. ja Pulliainen A.T. 2015. Molecular Detection of *Candidatus Bartonella hemsundetiensis* in Bats. — *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 15: 706–708.
- Luis A.D., Hayman D.T.S., O’Shea T.J., Cryan P.M., Gilbert A.T., Pulliam J.R.C., Mills J.N., Timonin M.E., Willis C.K.R., Cunningham A. a, Fooks A.R., Rupprecht C.E., Wood J.L.N. ja Webb C.T. 2013. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? — *Proceedings of the Royal Society B* 280: 20122753.
- Luonnontieteellinen keskusmuseo 2015. *Ohjeistus lepakoiden kiinniottamiseen, rengastukseen ja muuhun merkintään*. 9 s.
- Morse S.S., Mazet J. a K., Woolhouse M., Parrish C.R., Carroll D., Karesh W.B., Zambrana-Torrel C., Lipkin W.I. ja Daszak P. 2012. Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. — *Lancet* 380: 1956–65.
- Müller J., Müller K., Neinhuis C. ja Quandt D. 2010. PhyDE: Phylogenetic Data Editor.
- Muradrasoli S., Mohamed N., Hornyák Á., Fohlman J., Olsen B., Belák S. ja Blomberg J. 2009. Broadly targeted multiprobe QPCR for detection of coronaviruses: Coronavirus is common among mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). — *Journal of Virological Methods* 159: 277–287.
- Murray K., Selleck P., Hooper P., Hyatt A., Gould A., Gleeson L., Westbury H., Hiley L., Selvey L. ja Rodwell B. 1995. A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. — *Science* 268: 94–97.
- Negredo A., Palacios G., Vázquez-Morón S., González F., Dopazo H., Molero F., Juste J., Quetglas J., Savji N., de la Cruz Martínez M., Herrera J.E., Pizarro M., Hutchison S.K., Echevarría J.E., Lipkin W.I. ja Tenorio A. 2011. Discovery of an ebolavirus-like filovirus in europe. — *PLoS Pathogens* 7: e1002304.
- Nokireki T., Huovilainen A., Lilley T., Kyheröinen E.-M., Ek-Kommonen C., Sihvonen L. ja Jakava-Viljanen M. 2013. Bat rabies surveillance in Finland. — *BMC veterinary research* 9: 174.
- Nokireki T., Sironen T., Smura T., Karkamo V., Sihvonen L. ja Gadd T. 2017. Second case of European bat lyssavirus type 2 detected in a Daubenton’s bat in Finland. — *Acta Veterinaria Scandinavica* 59: 62.
- Nokireki T., Tammiranta N., Kokkonen U.-M., Kantala T. ja Gadd T. 2018. Tentative novel lyssavirus in a bat in Finland. — *Transboundary and Emerging Diseases* 1–4.
- Olival K.J., Hosseini P.R., Zambrana-torrel C., Ross N., Bogich T.L. ja Daszak P. 2017. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. — *Nature* 546: 646–650.
- Paradis E., Claude J. ja Strimmer K. 2004. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. — *Bioinformatics* 20: 289–290.
- Pauly M., Pir J.B., Loesch C., Sausy A., Snoeck C.J., Hübschen J.M. ja Muller C.P. 2017. Novel alphacoronaviruses and paramyxoviruses cocirculate with type 1 and severe acute respiratory system (SARS)-related betacoronaviruses in synanthropic bats of Luxembourg. — *Applied and Environmental Microbiology* 83: 1–14.
- Pebesma E.J. ja Bivand R.S. 2005. Classes and methods for spatial data in R. — *R News* 5: 9–13.
- Plowright R.K. ym. 2015. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. — *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282: 20142124.
- Pomeroy L.W., Bjørnstad O.N. ja Holmes E.C. 2008. The Evolutionary and Epidemiological Dynamics of the Paramyxoviridae. — *Journal of Molecular Evolution* 66: 98–106.

- Popescu A.A., Huber K.T. ja Paradis E. 2012. Ape 3.0: New tools for distance-based phylogenetics and evolutionary analysis in R. — *Bioinformatics* 28: 1536–1537.
- Puig-Montserrat X., Torre I., López-Baucells A., Guerrieri E., Monti M.M., Ràfols-García R., Ferrer X., Gisbert D. ja Flaquer C. 2015. Pest control service provided by bats in Mediterranean rice paddies: linking agroecosystems structure to ecological functions. — *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde* 80: 237–245.
- R Core Team 2015. R: A language and environment for statistical computing.
- Raj V.S., Mou H., Smits S.L., Dekkers D.H., Müller M.A., Dijkman R., Muth D., Demmers J.A., Zaki A., Fouchier R.A., Thiel V., Drosten C., Rottier P.J., Osterhaus A.D., Bosch B.J. ja Haagmans B.L. 2013. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. — *Nature* 495: 251–254.
- Rambaut A. 2016. FigTree: Tree Figure Drawing Tool.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A. ja Huelsenbeck J.P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. — *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Ruedi M., Stadelmann B., Gager Y., Douzery E.J.P., Francis C.M., Lin L.K., Guillén-Servent A. ja Cibois A. 2013. Molecular phylogenetic reconstructions identify East Asia as the cradle for the evolution of the cosmopolitan genus *Myotis* (Mammalia, Chiroptera). — *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 437–449.
- Simmons N.B. 2005: Order Chiroptera. Teoksessa D. E. Wilson & D. M. Reeder, toim. *Mammal Species of the World (3rd edition)*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md, s. 312–529.
- Simmons N.B., Seymour K.L., Habersetzer J. ja Gunnell G.F. 2008. Primitive Early Eocene bat from Wyoming and the evolution of flight and echolocation. — *Nature* 451: 818–821.
- De Souza Luna L.K., Heiser V., Regamey N., Panning M., Drexler J.F., Mulangu S., Poon L., Baumgarte S., Haijema B.J., Kaiser L. ja Drosten C. 2007. Generic detection of coronaviruses and differentiation at the prototype strain level by reverse transcription-PCR and nonfluorescent low-density microarray. — *Journal of Clinical Microbiology* 45: 1049–1052.
- Springer M.S. 2013. Phylogenetics: Bats United, Microbats Divided. — *Current Biology* 23: R999–R1001.
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. — *Bioinformatics* 30: 1312–1313.
- Suomen lepakkotieteellinen yhdistys ry 2017. Suomen lepakkolajit. — *Suomen lepakkotieteellinen yhdistys ry*. Osoitteessa: <http://www.lepakko.fi/suomen-lepakkolajit>. Viitattu 15. marraskuuta 2017.
- Takimoto T. ja Portner A. 2004. Molecular mechanism of paramyxovirus budding. — *Virus Research* 106: 133–145.
- Teeling E.C., Springer M.S., Madsen O., Bates P., O'Brien S.J. ja Murphy W.J. 2005. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. — *Science* 307: 580–584.
- Thibault P.A., Watkinson R.E., Moreira-Soto A., Drexler J.F. ja Lee B. 2017. Zoonotic potential of emerging paramyxoviruses: knowns and unknowns. — *Advances in Virus Research* 98: 1–55.
- Thompson J.D., Higgins D.G. ja Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. — *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.

- Tong S., Chern S.W.W., Li Y., Pallansch M.A. ja Anderson L.J. 2008. Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses. — *Journal of Clinical Microbiology* 46: 2652–2658.
- Tupinier Y. 2015: The Biological Sonar. Teoksessa M. Barataud, toim. *Acoustic Ecology of European Bats. Species Identification, Study of their Habitats and Foraging Behaviour*. Biotope, Méze; Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, s. 32–47.
- Veikkolainen V., Vesterinen E.J., Lilley T.M. ja Pulliainen A.T. 2014. Bats as reservoir hosts of human bacterial pathogen, *Bartonella mayotimonensis*. — *Emerging infectious diseases* 20: 960–7.
- WHO 2018. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). Osoitteessa: <http://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>. Viitattu 23. lokakuuta 2018.
- Widagdo W., Begeman L., Schipper D., van Run P.R., Cunningham A.A., Kley N., Reusken C.B., Haagmans B.L. ja van den Brand J.M. 2017. Tissue Distribution of the MERS-Coronavirus Receptor in Bats. — *Scientific Reports* 7: 1193.
- Woo P.C., Lau S.K., Huang Y. ja Yuen K.-Y. 2009. Coronavirus Diversity, Phylogeny and Interspecies Jumping. — *Experimental Biology and Medicine* 234: 1117–1127.
- Woo P.C., Lau S.K., Li K.S., Poon R.W., Wong B.H., Tsoi H., Yip B.C., Huang Y., Chan K. ja Yuen K. 2006. Molecular diversity of coronaviruses in bats. — *Virology* 351: 180–187.
- Woolhouse M.E., Haydon D.T. ja Antia R. 2005. Emerging pathogens: The epidemiology and evolution of species jumps. — *Trends in Ecology and Evolution* 20: 238–244.
- Young C.C.W. ja Olival K.J. 2016. Optimizing Viral Discovery in Bats W. Markotter, toim. — *PLOS ONE* 11: e0149237.
- Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D. ja Fouchier R.A. 2012. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. — *New England Journal of Medicine* 367: 1814–1820.

7 LIITTEET

7.1 PCR-REAKTIOT JA OHJELMAT

Taulukko 1. Koronavirusten seulonnassa käytetyn RT-qPCR-reaktion A) reaktioliuos ja B) PCR-ohjelma

A)	B)
<ul style="list-style-type: none">• 10 µl Quanta qScript One-Step SYBR Green qRT-PCR Kit, Low ROX• 1,2 µl 10 mM 11-FW (-> 0,6 µM)• 1,2 µl 10 mM 13-RW (-> 0,6 µM)• 0,4 µl qScript One-Step RT• 2,2 µl vesi• 5 µl näyte-RNA <p>Yhden reaktion tilavuus 20 µl</p>	<ol style="list-style-type: none">1. 10 min, 50 °C2. 5 min, 95 °C3. 10 s, 95 °C4. 20 s, 50 °C, mittaus lopussa5. 30 s, 72 °C6. Palaa 45 kertaa kohtaan 3.7. 1 min, 95 °C8. 30 s, 55 °C, mittaus siirryttäessä seuraavaan vaiheeseen9. 30 s, 95 °C10. 4 °C

Taulukko 2. Paramyxovirusten seulonnassa käytetyn RT-qPCR-reaktion A) reaktioliuos ja B) PCR-ohjelma

A)	B)
<ul style="list-style-type: none">• 10 µl Quanta qScript One-Step SYBR Green qRT-PCR Kit, Low ROX• 1,4 µl 10 mM qPAR-F (-> 0,7 µM)• 1,4 µl 10 mM qPAR-R (-> 0,7 µM)• 0,4 µl qScript One-Step RT• 4,8 µl vesi• 2 µl näyte-RNA <p>Yhden reaktion tilavuus 20 µl</p>	<ol style="list-style-type: none">1. 10 min, 50 °C2. 5 min, 95 °C3. 10 s, 95 °C4. 20 s, 55 °C, mittaus lopussa5. 30 s, 72 °C6. Palaa 45 kertaa kohtaan 3.7. 1 min, 95 °C8. 30 s, 55 °C, mittaus siirryttäessä seuraavaan vaiheeseen9. 30 s, 95 °C10. 4 °C

Taulukko 3. Seulonnassa positiivisiksi todettujen näytteiden RT-reaktion A) reaktioliuos ja B) PCR-ohjelma

A)	B)
<ul style="list-style-type: none">• 2 µl 10 mM dNTP mix• 1 µl random hexamer• 25 µl vesi• 10 µl RT-buffer• 1 µl RevertAid Premium• 1 µl RiboLock• 10 µl näyte-RNA (denaturoitu 3 minuuttia +95 °C ennen lisäämistä) <p>Yhden reaktion tilavuus 50 µl</p>	<ol style="list-style-type: none">1. 30 min 55 °C2. 5 min 85 °C3. 4 °C, reaktio jälle

Taulukko 4. Koronavirusten varmistamisessa käytettyjen RT-PCR-reaktioiden A) reaktioliuokset ja B) PCR-ohjelmat

<p>A)</p> <p>Ensimmäinen reaktio:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 15 µl Phusion 2x Master Mix (Thermo) • 0,5 µl 10 µM PC2S2 (a:b = 1:1) • 2,25 µl 10 µM PC2SAs1 (a:b:c = 1:1:1) • 7,25 µl vesi • 5 µl näyte-cDNA <p>Yhden reaktion tilavuus 30 µl</p> <p>Toinen reaktio:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 15 µl Phusion 2x Master Mix (Thermo) • 1,5 µl 10 µM PCS (a:b = 1:1) • 1,5 µl 10 µM PCNAs • 7 µl vesi • 5 µl ensimmäisen reaktion tuotetta <p>Yhden reaktion tilavuus 30 µl</p>	<p>B)</p> <p>Ensimmäinen PCR-ohjelma:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 1 min, 98 °C 2. 5 s, 98 °C 3. 10 s, 60 °C, jokaisella kierroksella vähennetään 1 °C 4. 15 s, 72 °C 5. Palaa 10 kertaa kohtaan 2. 6. 5 s, 98 °C 7. 10 s, 54 °C 8. 15 s, 72 °C 9. Palaa 40 kertaa kohtaan 6. 10. 1 min, 72 °C 11. 4 °C <p>Toinen PCR-ohjelma:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 1 min, 98 °C 2. 5 s, 98 °C 3. 10 s, 60 °C 4. 15 s, 72 °C 5. Palaa 45 kertaa kohtaan 2. 6. 1 min, 72 °C 7. 4 °C
---	--

Taulukko 5. Paramyoksovirusten varmistamisessa käytettyjen RT-PCR-reaktioiden A) reaktioliuokset ja B) PCR-ohjelma

<p>A)</p> <p>Ensimmäinen reaktio:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 10 µl Phusion 2x Master Mix (Thermo) • 2 µl 10 µM PAR-F1 • 2 µl 10 µM PAR-R • 4 µl vesi • 2 µl näyte-cDNA <p>Yhden reaktion tilavuus 20 µl</p> <p>Toinen reaktio:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 10 µl Phusion 2x Master Mix (Thermo) • 2 µl 10 µM PAR-F2 • 2 µl 10 µM PAR-R • 4 µl vesi • 2 µl ensimmäisen reaktion tuotetta <p>Yhden reaktion tilavuus 20 µl</p>	<p>B)</p> <p>PCR-ohjelma molemmissa reaktioissa:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 1 min, 95 °C 2. 30 s, 95 °C 3. 30 s, 50 °C 4. 1 min, 72 °C 5. Palaa 40 kertaa kohtaan 2. 6. 5 min, 72 °C 7. 4 °C
---	--

7.2 GENBANKISTA NOUDETUT SEKVENSSIT

Viitenumero	Nimi	Isäntälaji	Maa	Lepakkovirus	Pitkä sekvenssi
AY391777.1	Human coronavirus OC43	ihminen	Iso-Britannia		x
DQ011855.1	Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus	sika	Belgia		x
DQ022305.2	Bat SARS coronavirus HKU3-1	Rhinolophus sinicus	Kiina	x	x
EF065513.1	Bat coronavirus HKU9-1	Rousettus lechenaulti	Kiina	x	x
EF424623.1	Giraffe coronavirus US/OH3/2003	kirahvi	Yhdysvallat		x
FJ647225.1	Murine coronavirus inf-MHV-A59	kotihiri	Yhdysvallat		x
FJ938068.1	Rat coronavirus Parker	rotta	Yhdysvallat		x
GU190215.1	Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008	Rhinolophus blasii	Bulgaria	x	x
JX860640.1	Canine respiratory coronavirus	koira	Etelä-Korea		x
JX869059.2	Human betacoronavirus 2c EMC/2012	ihminen	Saudi-Arabia		x
KC545383.1	Betacoronavirus Erinaceus/VMC/DEU/2012	siili	Saksa		x
KC545386.1	Betacoronavirus Erinaceus/VMC/DEU/2012	siili	Saksa		x
KC869678.4	Coronavirus Neoromicia/PML-PHE1/RSA/2011	Neoromicia capensis	Etelä-Afrikka	x	x
NC_004718.3	SARS coronavirus	ihminen	Kanada		x
NC_006577.2	Human coronavirus HKU1	ihminen	Kiina		x
NC_017083.1	Rabbit coronavirus HKU14	kaniini	Kiina		x
AF353511.1	Porcine epidemic diarrhea virus strain CV777	sika	Belgia		x
AF304460.1	Human coronavirus 229E	ihminen	konstrukt		x
AY567487.2	Human Coronavirus NL63	ihminen	Alankomaat		x
KJ399978.1	Porcine epidemic diarrhea virus strain OH851	sika	Yhdysvallat		x
KY073747.1	229E-related bat coronavirus strain BtKY229E-1	Hipposideros sp.	Kenia	x	x
KY073745.1	NL63-related bat coronavirus strain BtKYNL63-9b	Triaenops afer	Kenia	x	x
KY073744.1	NL63-related bat coronavirus strain BtKYNL63-9a	Triaenops afer	Kenia	x	x
KY073748.1	229E-related bat coronavirus strain BtKY229E-8	Hipposideros vittatus	Kenia	x	x
JQ410000.1	Alpaca respiratory coronavirus isolate CA08-1/2008	alpaka	Yhdysvallat		x
KC545385.1	Betacoronavirus Erinaceus/VMC/DEU/2012	siili	Saksa		
GQ404795.1	Bat coronavirus SLO1A0066/2008/SVN	Rhinolophus hipposideros	Slovenia	x	
GQ259977.1	Coronavirus P.pipi/VM314/2008/NLD	Pipistrellus pipistrellus	Alankomaat	x	
KJ652335.1	Coronavirus BtCoV/E63/HUN/2013	Rhinolophus euryale	Unkari	x	
HQ184062.1	Betacoronavirus E.isa/M/Spain/2007	Eptesicus isabellinus	Espanja	x	
HQ184059.1	Betacoronavirus H.sav/J/Spain/2007	Hypsugo savii	Espanja	x	
KF500941.1	Betacoronavirus Nyctalus noctula/Italy/206679-5/2010	Nyctalus noctula	Italia	x	
KF500940.1	Betacoronavirus H.sav/Italy/206645-40/2011	Hypsugo savii	Italia	x	
KF500946.1	Betacoronavirus Pipistrellus kuhlii/Italy/206645-53/2011	Pipistrellus kuhlii	Italia	x	
KF500951.1	Betacoronavirus Pipistrellus/Italy/49967-19/2010	Pipistrellus sp.	Italia	x	
GU190220.1	Bat coronavirus BM48-48/BGR/2008	Rhinolophus blasii	Bulgaria	x	
GU190225.1	Bat coronavirus BM98-05/BGR/2008	Rhinolophus euryale	Bulgaria	x	
GU190226.1	Bat coronavirus BB98-43/BGR/2008	Rhinolophus euryale	Bulgaria	x	
KF312399.1	Betacoronavirus Eptesicus/13RS384 26/Italy/2012	Eptesicus serotinus	Italia	x	
KC886322.1	Bat coronavirus P.davyi49/Mexico/2012	Pteronotus davyi	Meksiko	x	
KC633193.1	Betacoronavirus BtCoV/KCR180/Pte par/CRC/2012	Pteronotus parnellii	Costa Rica	x	
JQ731780.1	Coronavirus BtCoV/KCR370/Pte par/CRC/2011	Pteronotus parnellii	Costa Rica	x	
DQ074652.1	Tylonycteris bat coronavirus HKU4	Tylonycteris pachypus	Kiina	x	
DQ249217.1	Pipistrellus bat coronavirus HKU5	Pipistrellus abramus	Kiina	x	
DQ249218.1	Pipistrellus bat coronavirus HKU5	Pipistrellus abramus	Kiina	x	
FJ710043.1	Bat coronavirus Hipposideros/GhanaBoo/348/2008	Hipposideros caffer ruber	Ghana	x	

FJ710047.1	Bat coronavirus Hipposideros/GhanaKwam/20/2008	Hipposideros caffer ruber	Ghana	x	
KJ020636.1	Bat coronavirus BtCoV/B56054/H.lar/RD/Tha/1/2013	Hipposideros larvatus	Thaimaa	x	
KJ020621.1	Bat coronavirus BtCoV/BRT55630/H.lek/CK/Tha/05/2012	Hipposideros lekaguli	Thaimaa	x	
KJ020605.1	Bat coronavirus BtCoV/B55735/C.sph/CB/Tha/5/2012	Cynopterus sphinx	Thaimaa	x	
KJ020622.1	Bat coronavirus BtCoV/BRT55629/H.lek/CK/Tha/05/2012	Hipposideros lekaguli	Thaimaa	x	
KJ868722.1	Bat coronavirus BtCoV/B55700-2/C.sph/CB/Tha/5/2012	Cynopterus sphinx	Thaimaa	x	
KJ020608.1	Bat coronavirus BtCoV/B55740/S.kuh/CB/Tha/6/2012	Scotophilus kuhlii	Thaimaa	x	
GU065422.1	Kenya bat coronavirus BtKY78	Rousettus aegyptiacus	Kenia	x	
AB683970.1	Bat coronavirus 2265/Philippines/2010	Ptenochirus jagori	Filippiinit	x	
AB539081.1	Bat coronavirus Philippines/Diliman1525G2/2008	Cynopterus brachyotis	Filippiinit	x	
EU375875.1	Bat coronavirus M.dau/Germany/D8.32/2007	Myotis daubentonii	Saksa	x	
EU375871.1	Bat coronavirus M.dau/Germany/D8.46/2007	Myotis daubentonii	Saksa	x	
EU375869.1	Bat coronavirus P.nat/Germany/D5.73/2007	Pipistrellus nathusii	Saksa	x	
JF440352.1	Bat coronavirus M.daubentonii/UK/Wyt/972A	Myotis daubentonii	Iso-Britannia	x	
JF440350.1	Bat coronavirus M.daubentonii/UK/Wyt/964Co	Myotis daubentonii	Iso-Britannia	x	
HQ184056.1	Alphacoronavirus M.dau/H/Spain/2007	Myotis daubentonii	Espanja	x	
KJ652334.1	Coronavirus BtCoV/V16/HUN/2013	Myotis daubentonii	Unkari	x	
GQ259972.1	Coronavirus M.dau/VM303/2008/NLD	Myotis daubentonii	Alankomaat	x	
GQ259971.1	Coronavirus M.dau/VM222/2007/NLD	Myotis daubentonii	Alankomaat	x	
GU190240.1	Bat coronavirus BR98-55/BGR/2008	Miniopterus schreibersii	Bulgaria	x	
GU190248.1	Bat coronavirus BR98-53/BGR/2008	Miniopterus schreibersii	Bulgaria	x	
DQ249226.1	Bat coronavirus HKU7	Miniopterus magnater	Kiina	x	
GU190243.1	Bat coronavirus BR98-30/BGR/2008	Miniopterus schreibersii	Bulgaria	x	
GQ259961.1	Coronavirus N.noc/VM176/2007/NLD	Nyctalus noctula	Alankomaat	x	
GU190239.1	Bat coronavirus BNM98-30/BGR/2008	Nyctalus leisleri	Bulgaria	x	
JQ731778.1	Coronavirus BtCoV/KCR24/Ano geo/CRC/2010	Anoura geoffroyi	Costa Rica	x	
JQ731784.1	Coronavirus BtCoV/KP256/Art jam/PAN/2010	Artibeus jamaicensis	Panama	x	
GU190232.1	Bat coronavirus BB98-15/BGR/2008	Rhinolophus blasii	Bulgaria	x	
HM368166.1	Bat coronavirus N78-10/Germany/2008	Myotis myotis	Saksa	x	
DQ249224.1	Bat coronavirus HKU6	Myotis ricketti	Kiina	x	
GU190216.1	Bat coronavirus NM98-62/GER/2008	Myotis daubentonii	Saksa	x	
JQ731782.1	Coronavirus BtCoV/KP816/Phy dis/PAN/2011	Phyllostomus discolor	Panama	x	
JQ731785.1	Coronavirus BtCoV/KP524/Art jam/PAN/2010	Artibeus jamaicensis	Panama	x	
FJ710046.1	Bat coronavirus Hipposideros/GhanaKwam/19/2008	Hipposideros caffer ruber	Ghana	x	
FJ710045.1	Bat coronavirus Hipposideros/GhanaKwam/8/2008	Hipposideros caffer ruber	Ghana	x	
GU190237.1	Bat coronavirus 1B BR98-19/BGR/2008	Rhinolophus euryale	Bulgaria	x	
EU420137.1	Bat coronavirus 1B AFCD307	Miniopterus pusillus	Kiina	x	x
HQ728484.1	Miniopterus bat coronavirus/Kenya/KY27/2006	Miniopterus natalensis	Kenia	x	x
HQ728485.1	Miniopterus bat coronavirus/Kenya/KY33/2006	Miniopterus inflatus	Kenia	x	x
JQ989273.1	Hipposideros bat coronavirus HKU10	Hipposideros pomona	Kiina	x	x
JQ989270.1	Rousettus bat coronavirus HKU10	Rousettus leschenaulti	Kiina	x	x
HQ728480.1	Cardioderma bat coronavirus/Kenya/KY43/2006	Cardioderma cor	Kenia	x	x
DQ648858.1	Scotophilus bat coronavirus 512	Scotophilus kuhlii	Kiina	x	x
EU769557.1	Bat coronavirus Trinidad/1FY2BA/2007	Carollia perspicillata	Trinidad ja Tobago	x	x
HQ728486.1	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006	Chaerephon sp.	Kenia	x	x
HQ728481.1	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY41/2006	Chaerephon pumilus	Kenia	x	x
EF203064.1	Rhinolophus bat coronavirus HKU2	Rhinolophus sinicus	Kiina	x	x
EF544563.1	Rocky Mountain Bat Coronavirus 11	Myotis occultus	Yhdysvallat	x	

EF544566.1	Rocky Mountain Bat Coronavirus 65	Eptesicus fuscus	Yhdysvallat	x
EF544567.1	Rocky Mountain Bat Coronavirus 3	Myotis occultus	Yhdysvallat	x
KY009612.1	Bat coronavirus strain C072/China/2015	Myotis fimbriatus	Kiina	x
KY009614.1	Bat coronavirus strain C081/China/2015	Myotis pequinius	Kiina	x
KY009617.1	Bat coronavirus strain C129/China/2015	Rhinolophus pusillus	Kiina	x
KY009620.1	Bat coronavirus strain C008/China/2015	Myotis fimbriatus	Kiina	x
KY009623.1	Bat coronavirus strain C051/China/2015	Myotis fimbriatus	Kiina	x
KY009625.1	Bat coronavirus strain C005/China/2015	Myotis ricketti	Kiina	x
KY009626.1	Bat coronavirus strain C060/China/2015	Eptesicus serotinus	Kiina	x
KY009627.1	Bat coronavirus strain C059/China/2015	Eptesicus serotinus	Kiina	x
KY009630.1	Bat coronavirus strain C067/China/2015	Myotis fimbriatus	Kiina	x
KY009632.1	Bat coronavirus strain C056/China/2015	Eptesicus serotinus	Kiina	x
KY009634.1	Bat coronavirus strain C091/China/2015	Eptesicus serotinus	Kiina	x
KY502384.1	BtCoV/Myotis emarginatus/LUX/LUX15_A_48/2015	Myotis emarginatus	Luxemburg	x
KY502395.1	BtCoV/Rhinolophus ferrumequinum/LUX/LUX16_A_24/2016	Rhinolophus ferrumequinum	Luxemburg	x
KY502388.1	BtCoV/Myotis emarginatus/LUX/LUX15_A_158/2015	Myotis emarginatus	Luxemburg	x
